



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

## **LIPÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS NO RÚMEN**

Chica Costa Ernesto Manuel

### **CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor José Pedro Lemos da Costa  
Cardoso de Lemos

Doutor André Martinho de Almeida

Doutora Susana Paula Almeida Alves

### **ORIENTADORA:**

Doutora Susana Paula Almeida Alves

### **COORDINADOR:**

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

2019  
LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

## **LIPÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS NO RÚMEN**

Chica Costa Ernesto Manuel

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA/PRODUÇÃO ANIMAL

### **CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor José Pedro Lemos da Costa  
Cardoso de Lemos

Doutor André Martinho de Almeida

Doutora Susana Paula Almeida Alves

### **ORIENTADORA:**

Doutora Susana Paula Almeida Alves

### **COORIENTADOR:**

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

2019  
LISBOA

*“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem fazem muito e nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”.*

Theodore Roosevelt

Aos meus pais **Costa Ernesto Manuel e Celestina Rita António** (*in memoriam*) e a  
minha família.

**DEDICO...**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida, e por iluminar o meu caminho em todos momentos da minha vida.

Ao Instituto de bolsas de Estudo e Universidade Zambeze de Moçambique, foi a partir destas instituições que tive a oportunidade de frequentar este mestrado.

Aos projetos PTDC/CAL-ZOO/29654/2017 e UID/CVT/276/2019 pelo apoio financeiro do projeto que culminou com a realização desta dissertação.

À Doutora Susana Paula Almeida Alves, pela orientação, disponibilidade de tempo dispensado, pelos conhecimentos científicos transmitidos e instrução de práticas laboratórias, pela paciência, atenção, pelo seu incentivo e pelo apoio disponibilizado durante todas atividades para realização desta dissertação.

Ao Professor Rui Bessa, meu coorientador, pela orientação, pelo incentivo e pela disponibilidade de tempo dispensado para correções e apoio durante a realização do trabalho.

À Universidade de Lisboa – FMV e ISA, aos professores ligado ao curso e a toda Direcção pela formação pessoal, e profissional transmitida.

Ao meu Marido Clementino Nanvaro, pelo carinho, paciência, conhecimentos, conselhos e compreensão que estiveram presentes nos bons e maus momentos durante esta fase da minha vida.

À minha filha Clercia Lemos, por alegrar todos os meus dias nesta etapa que juntas enfrentamos, pela diversão e amor.

À minha amiga Flávia Andrade, por todos momentos que passamos juntas ao longo das aulas, pelos passeios lindos, diversão, apoio e incentivo durante todo período.

Ao meu amigo Daniel Tito, pela convivência, pelos conselhos, apoio e incentivo ao longo deste momento.

Aos meus irmãos, Ernesto, Carlota, Joaquina e Maria Emilia, pelo apoio e força em bons e maus momentos, pelo amor e carinho.

E a todos que directa ou indirectamente contribuíram para a conclusão desse trabalho, o meu muito obrigada!

## Resumo

### Lipólise de triacilgliceróis no rúmen

A inclusão de suplementos lipídicos, geralmente compostos por triacilgliceróis, na dieta de ruminantes permite aumentar o seu desempenho produtivo e alterar a composição lipídica dos seus produtos. Sabe-se que os triacilgliceróis ingeridos são extensivamente hidrolisados no rúmen (i.e., lipólise), mas pouco se conhece sobre o comportamento cinético da lipólise de diferentes tipos de triacilgliceróis. O objetivo geral deste trabalho consistiu na avaliação da lipólise de diferentes triacilgliceróis (TGL-16:0/16:0/16:0, TGL-18:0/18:0/18:0, TGL-18:1/18:1/18:1, TGL-18:2/18:2/18:2 e TGL-18:3/18:3/18:3) através de estudos *in vitro* com inóculo ruminal durante 0, 0,5, 2, 4 e 6 horas de incubação. Especificamente pretendeu-se avaliar na lipólise o efeito do comprimento da cadeia e grau de insaturação dos AG no triacilglicerol. Adicionalmente analisaram-se os produtos provenientes da biohidrogenação e síntese microbiana. Através dos resultados obtidos constatou-se que o desaparecimento dos triacilgliceróis testados aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) ao longo do tempo de incubação com os TGL-16:0, TGL-18:1 $\omega$ 9 e TGL-18:2 $\omega$ -6 e não se verificaram diferenças significativas ( $P = 0,726$ ) a partir das 0,5 horas no desaparecimento do TGL-18:3 $\omega$ -3 até às 6 horas de incubação. O TGL-18:0 foi o que apresentou um menor grau de lipólise após 6 horas e o TGL-16:0 foi o que apresentou numericamente um maior grau de lipólise. Nas incubações com os TGL-16:0 e TGL-18:0 ao longo das 6 horas não se verificou grandes diferenças na composição em ácidos gordos na fração dos ácidos gordos livres. Nas incubações com os TGL-18:1, TGL-18:2 e TGL-18:3, a fração dos ácidos gordos livres mostrou um padrão de ácidos gordos coerentes com os gerados durante as vias de biohidrogenação ruminal conhecidas do 18:1 $\omega$ 9, 18:2 $\omega$ -6 e 18:3 $\omega$ -3, respetivamente.

O desaparecimento de matéria seca assim como as variações na concentração de plasmalogénios, analisados na forma de dimetil acetais, e também dos ácidos gordos ramificados sugere-se que não houve inibição do crescimento microbiano. Conclui-se que a composição dos triacilgliceróis influencia pouco a sua suscetibilidade à lipólise no rúmen, no entanto em trabalhos futuros dever-se-ia aumentar o tempo de incubação *in vitro*, assim como testar outros lípidos, com diferentes composições em ácidos gordos.

Palavras chaves: Triacilgliceróis, fosfolípidos, ácidos gordos, lipólise e rúmen.

## Abstract

### Lipolysis of triacylglycerols in the rumen

The inclusion of lipid supplements, mostly comprised by triacylglycerols, in ruminant diets have been used to improve productive performance and to modify the lipid composition of their products in order to improve their nutrition value. It is well known that triacylglycerols are extensively hydrolyzed (i.e. lipolysis) in the rumen but it is not known if the lipolysis kinetics differ with different triacylglycerols.

The main objective of this work was to evaluate the lipolysis of five triacylglycerols (TGL-16:0/16:0/16:0, TGL-18:0/18:0/18:0, TGL-18:1/18:1/18:1, TGL-18:2/18:0/18:2 e TGL-18:3/18:3/18:3) using *in vitro* incubations with rumen inoculum during 0, 0.5, 2, 4 and 6 hours. The specific aim was to evaluate the effect of the fatty acid length and level of unsaturation in the lipolysis. Additionally, the products from biohydrogenation and microbial synthesis were also analyzed. According to the results, we observed that the triacylglycerols disappearance increased significantly ( $P<0.05$ ) with increasing incubation time when the TGL-16:0, TGL-18:1c9 e TGL-18:2n-6 were tested, but no significant differences ( $P=0,726$ ) were observed between the 0.5 and 6 hours of incubation when TGL-18:3 was used. The TGL-18:0 showed the lowest level of lipolysis at 6 hours of incubation whereas the TGL-16:0 showed the numerically highest level. There was no great differences in the fatty acid composition of free fatty acid fraction during the 6 hours of incubation with TGL-16:0 and TGL-18:0. In incubations with TGL-18:1, TGL-18:2 and TGL-18:3, the free fatty acid fraction showed a fatty acid profile consistent with the fatty acids formed during the ruminal biohydrogenation pathways of 18:1c9, 18:2n-6 and 18:3n-3, respectively. The dry matter disappearance as well as changes in the concentration of plasmalogens, analyzed as dimethyl acetals, and also the branched chain fatty acids concentration, suggest that there was no inhibition of growth or activity of the microbial population. Concluding, the composition of triacylglycerols little affected its susceptibility to lipolysis in the rumen, however in future work the incubation time should be increased beyond the 6 hours, and other lipids, with different fatty acid compositions, should be tested.

Key words: triacylglycerols, phospholipids, fatty acids, lipolysis, rumen.



## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
ABREVIATURAS E SIGLAS .....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Conceito e classificação dos lípidos .....	3
2.1.1. Ácidos gordos .....	3
3. Ácidos Gordos Saturados .....	4
Ácidos Gordos Insaturados.....	6
2.1.2. Triacilgliceróis .....	8
2.1.3. Fosfolípidos .....	10
2.2. Importância dos lípidos .....	11
2.3 Metabolismo dos lípidos no rúmen .....	13
2.3.1 Lipólise .....	14
2.3.2 Biohidrogenação .....	17
2.3.3. Síntese microbiana .....	19
3. OBJETIVOS.....	22
a) OBJETIVO GERAL .....	22
b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Delineamento experimental .....	23
4.2. Incubação <i>in vitro</i> .....	23
4.3. Análise das amostras.....	26
5. RESULTADOS .....	30
5.1. Desaparecimento da matéria seca .....	30

5.2. Hidrólise dos triacilgliceróis .....	30
5.3. Ácidos gordos na fração dos ácidos gordos livres.....	32
5.4. Ácidos gordos e dimetil acetais na fração dos fosfolípidos.....	38
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
ANEXOS.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo dos vários tipos de ácidos gordos. ....	4
Figura 2. Triacilgliceróis (adaptado de Christie 2018). ....	8
Figura 3. Exemplo de estrutura dos fosfolípidos (Adaptado de Santana et al. 2017)...	10
Figura 4. Exemplo de um plasmalogénio (Plasmeniletanolamina), em que ligado ao glicerol (vermelho) contém: um éter vinílico C16:0 (verde), um ácido gordo saturado C18:0 (azul), e na cabeça polar contém uma etanolamina (rosa). ....	11
Figura 5. Representação esquemática do metabolismo lipídico no rúmen. ....	14
Figura 6. Vias principais de biohidrogenação do ácido linoleico e ácido $\alpha$ -linolénico no rúmen (adaptado de Harfoot and Hazlewood, 1997). ....	18
Figura 7. Identificação dos tubos de incubação (A) e pesagem de 60 g de alimento diretamente no tubo (B). ....	24
Figura 8. Preparação da solução tampão (A) e saturação com CO <sub>2</sub> durante a noite até passagem de cor azul (B) a incolor (C). ....	24
Figura 9. Procedimento de colheita do conteúdo ruminal de uma ovelha fistulada (A), filtração (B), diluição e saturação com CO <sub>2</sub> (C). ....	25
Figura 10. Liofilização das amostras (A), pesagem (B) e extração dos lípidos (C). ....	26
Figura 11. Separação das frações lipídicas por SPE (A) e evaporação do solvente (B). ....	27
Figura 12. Análise por GC-FID. ....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ácidos gordos saturados e suas particularidades (Adaptado de Santana et al. 2017) .....	5
Tabela 2. Alguns exemplos e características de AGI de importância fisiológica e nutricional (Adaptado de Santana et al. 2017) .....	6
Tabela 3. Distribuição dos principais triacilgliceróis (% total de TGL) nos óleos de girassol, milho e soja (adaptado de Gao et al. 2017). .....	9
Tabela 4. Composição em AG (% em peso para o total) dos lípidos da dieta, do rúmen total e das frações lipídicas do rúmen (adaptado de Harfoot e Hazlewood, 1997). ....	13
Tabela 5. Revisão de alguns estudos sobre a lipólise no rúmen. ....	16
Tabela 6. Composição em ácidos gordos ramificados e cadeia ímpar (g/100g total AG) de algumas bactérias ruminais (adaptado de Vlaeminck et al. 2006). ....	21
Tabela 7. Desaparecimento (%) dos AG de cada um dos triacilgliceróis estudados durante 6 horas de incubação <i>in vitro</i> com inóculo ruminal. ....	32
Tabela 8. - Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-16:0 como substrato. ....	33
Tabela 9. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-18:0 como substrato. ....	34
Tabela 10. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-18: c9 como substrato. ....	35
Tabela 11. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG livres com a utilização de TGL-18:2n-6 como substrato. ....	36
Tabela 12. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-18:3n-3 como substrato. ....	37

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

% - percentagem

°C – graus celsius

µg – micrograma

µL – microlitro

AG – ácido gordo

AGI – ácido gordo insaturado

AGMI – ácido gordo monoinsaturado

AGPI – ácidos gordos polinsaturados

AGR – ácido gordo ramificado

AGS – ácido gordo saturado

BI - biohidrogenação

C – carbono

Ca-PFAD – sais de cálcio de óleo de palma destilado

CLA – ácido linoleico conjugado

CLNA – ácido linolénico conjugado

g – grama

GC – cromatografia gasosa

GC-FID – cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama

h – hora

IB – intermediários da biohidrogenação

mg – miligramas

mL – mililitros

MS – matéria seca

PPO – polifenol oxidase

RBI – biohidrogenação ruminal

SPE – extração em fase sólida

t - trans

TGL – triacilgliceróis

TLC – cromatografia em camada fina

v/v – Volume/volume

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente os consumidores valorizam características da carne e do leite, em particular as que afetam a saúde. Diante desta preocupação, e com a procura de produtos considerados saudáveis, tem despertado a necessidade de modificar a composição dos alimentos principalmente no que diz respeito ao perfil lipídico dos produtos derivados dos ruminantes (Oliveira et al. 2013).

A designação de lípidos engloba diversos compostos químicos bastante diferenciados entre si, no entanto os ácidos gordos são a classe presente em maior quantidade na fração dos compostos lipídicos (Sant' Ana 2004). A composição em ácidos gordos nos tecidos dos ruminantes pode ser influenciada por fatores de ordem interna (idade, sexo, genética), como por fatores externos aos animais como manejo alimentar e dieta. Sendo que a manipulação da dieta é o fator com maior influência no perfil de ácidos gordos da carne e leite de ruminantes (Oliveira et al. 2013).

No entanto, o perfil da gordura dos ruminantes é caracterizado por possuir elevada concentração de ácidos gordos saturados e reduzida concentração em ácidos gordos insaturados quando comparados com os monogástricos. Devido a este motivo os produtos derivados dos ruminantes, são por vezes considerados prejudiciais para a saúde quando consumidos em grandes quantidades, ficando por vezes associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, aumento do risco de diabetes e determinados tipos de cancro (Solomon et al. 1990; Ferreira 2016; Bessa 2019). Em contrapartida, os produtos de ruminantes também possuem ácidos gordos bioativos, ou seja, que são conhecidos por serem benéficos à saúde humana, como alguns isómeros do ácido linoleico conjugado (CLA) (Lourenço et al. 2010).

Portanto, a produção de carne ou leite com níveis adequados de gordura, e com menores concentrações de ácidos gordos saturados e maiores concentrações de ácidos gordos polinsaturados, é um desafio a alcançar (Costa et al. 2008). A extensa metabolização dos lípidos que ocorre no rúmen, levada a cabo pela população microbiana, é o principal obstáculo a ultrapassar para se conseguir enriquecer os produtos dos ruminantes em ácidos gordos polinsaturados. De facto, no rúmen os lípidos são primeiramente hidrolisados das fontes alimentares (triacilgliceróis, fosfolípidos, galactolipídios), através do processo de lipólise, e posteriormente sujeitos ao processo de bioidrogenação, que consiste na isomerização e consecutivas hidrogenações das insaturações dos ácidos gordos, levando à formação de ácidos gordos saturados como produto final (Harfoot and Hazlewood 1997).

A maior parte dos estudos nesta área tem-se focado largamente no processo de biohidrogenação dos ácidos gordos polinsaturados levada a cabo pela comunidade microbiana. Não obstante, a extensão da lipólise no rúmen, é um dos principais requisitos determinante da biohidrogenação, uma vez que a lipólise é essencial para que se desenrole o processo da biohidrogenação. Deste modo é fundamental perceber a especificidade das enzimas lipolíticas relativamente aos substratos dos lípidos que poderão ser utilizados na alimentação de ruminantes.

A crescente utilização de lípidos estruturados na alimentação humana, tem levado ao aparecimento de novos processos de interesterificação de triacilgliceróis, o que poderá reduzir os custos de preparação destes lípidos e consequentemente a sua utilização na alimentação animal. No entanto, não existem estudos sobre a utilização destes lípidos na alimentação de ruminantes, nomeadamente no que diz respeito à resistência à lipólise ou à biohidrogenação ruminal, realçando assim o interesse em estudar este tipo de lípidos.

Para estudar o metabolismo lipídico no rúmen, sem a utilização de muitos animais, e ao mesmo tempo avaliar o efeito de grande número de fatores, utiliza-se frequentemente as técnicas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal. Esta técnica permite fazer uma primeira seleção dos fatores ou substratos com melhor potencial, para posteriormente serem testados ou utilizados em animais *in vivo*. Assim, este trabalho enquadra-se no âmbito de um projeto científico que pretende estudar *in vitro* a metabolização no rúmen de diferentes lípidos estruturados. Os lípidos a estudar irão variar na espécie lipídica (triacilgliceróis ou fosfolípidos), e a composição dos ácidos gordos em cada espécie lipídica irá diferir no tamanho da cadeia carbonada, no grau de insaturação e na posição que ocupam no glicerol. O projeto pretende assim explorar quais as espécies lipídicas com maior capacidade de resistir à lipólise no rúmen e assim com maior potencial de escapar à biohidrogenação ruminal, e consequentemente poderem ser utilizadas na alimentação de ruminantes como forma de transferir ácidos gordos com maior interesse biológico para os tecidos dos ruminantes. Nesta dissertação serão apenas estudados diferentes triacilgliceróis com diferentes tamanhos de cadeia e grau de insaturação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Conceito e classificação dos lípidos

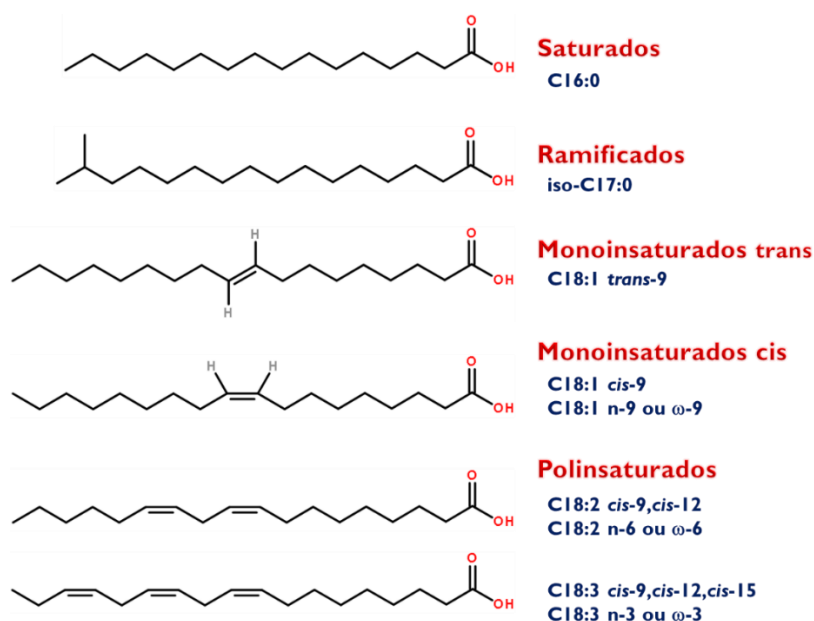
Os lípidos podem ser classificados fundamentalmente em dois grandes grupos: “simples” e “complexos”. “Lípidos simples” são aqueles que produzem na sua hidrólise no máximo dois tipos de produtos de hidrólise primária por mole (por exemplo: ácidos gordos, esteróides e acilgliceróis), “Lípidos complexos” são aqueles que produzem três ou mais produtos de hidrólise primária por mole (por exemplo: glicerofosfolípidos e glicoesfingolípidos) (Fahy et al. 2005). Sendo também conveniente analisar em termos de lípidos de reserva (ex. triacilgliceróis) *versus* os lípidos estruturais, ou seja, os lípidos presentes maioritariamente nas membranas, como a maioria dos lípidos complexos (ex. fosfolípidos) (Christie 2019). As diferentes classes de lípidos encontram-se relacionadas essencialmente pelas suas propriedades físicas, mais do que pelas suas propriedades químicas. Sendo, um grupo heterogéneo de compostos apresentam propriedades comuns que é a insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (Botham and Mayes 2012). Dentro destes grupos de lípidos, nesta revisão será dado maior destaque às classes lipídicas analisadas neste trabalho: ácidos gordos (AG), triacilgliceróis e fosfolípidos.

#### 2.1.1. Ácidos gordos

Os AG são constituídos por um grupo carboxílico (parte hidrofílica) e uma cadeia curta, média ou longa de hidrocarbonetos (parte hidrofóbica) que poderá ser na sua maioria linear, ramificada e/ou insaturada, ou mesmo conter grupos hidroxilo ( $-OH$ ) ou oxo ( $=O$ ). Os AG constituem as unidades estruturais de muitas classes de lípidos, conferindo-lhes a sua natureza oleosa ou gordurosa. Geralmente estes não ocorrem em estado livre nas células ou nos tecidos, mas derivam da hidrólise dos lípidos (Lehninger 1997; Motta 2009). De uma forma genérica os AG podem ser divididos em dois grandes grupos principais: AG saturados e AG insaturados (Lehninger 1997; Christie 2019). A nomenclatura simplificada dos AG inclui o número de carbonos da cadeia e o número de insaturações separada por dois pontos (exemplo: 16:0, no caso de AG com cadeia linear de 16 carbonos e nenhuma insaturação). A posição das duplas ligações nos AG é identificada pela configuração *cis* (*c*) ou *trans* (*t*) seguida do número do carbono onde ocorre a insaturação contada a partir do grupo hidroxilo. Em alternativa pode-se utilizar



a nomenclatura “ômega-X” ou “n-X” para AG com insaturações *cis*, onde X é o número do carbono onde ocorre a primeira dupla ligação contada a partir do final da cadeia carbonada (Exemplo: ácido linoleico, 18:2*cis*-9, *cis*-12 ou 18:2n-6). Exemplo dos vários tipos de AG é apresentada na Figura 1.



**Figura 1. Exemplo dos vários tipos de ácidos gordos.**

## Ácidos Gordos Saturados

Os AG saturados (AGS) possuem cadeias carbonadas unidas por ligações simples entre os seus átomos de carbono, podem, no entanto, conter ramificações ao longo da cadeia carbonada (AG ramificados). Os AG ramificados mais comuns são os que contêm ramificações com grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) no último carbono (denominados de AG ramificados *iso*) ou no penúltimo carbono (denominados de AG ramificados *anteiso*). Os AGS de cadeia longa têm pontos de fusão relativamente altos, daí que as gorduras animais e vegetais ricas em AGS são sólidas à temperatura ambiente e insolúveis em água (Christie 2019). Os AG de cadeia curta (C1 a C6) e média (C7 a C12) apresentam solubilidade relativa em água. Alguns exemplos de AGS e suas particularidades estão apresentados na Tabela 1. Os AGS mais abundantes nos tecidos animais e vegetais são compostos de cadeia linear com 14, 16 e 18 átomos de carbono. Para além de serem uma fonte de energia nos tecidos, os AGS de cadeia longa fornecem algumas propriedades benéficas aos lípidos nas membranas conferindo-lhes rigidez quando necessário e controlando as atividades das proteínas de membrana através de ligações

covalentes. Os AGS são especialmente importantes na função dos esfingolípídeos, uma vez que são capazes de alterar a espessura da membrana plasmática (Christie 2019).

**Tabela 1. Ácidos gordos saturados e suas particularidades (Adaptado de Santana et al. 2017)**

Nome comum	Número de átomos de carbono	Observações
Fórmico	1	Faz parte no metabolismo de unidades de “C” (Formato)
Acético	2	Principal produto final da fermentação de hidratos de carbono por organismos do rúmen. Precursor na síntese de lípidos
Propiônico	3	Um produto final de fermentação de hidratos de carbono por organismos do rúmen. Importante precursor de alguns aminoácidos
Butírico	4	Produto da fermentação da fibra no rúmen. Muito abundante na gordura de leite de ruminantes
Valérico	5	Detetado na gordura de leite de ruminantes
Caproico	6	Detetado na gordura de leite de ruminantes
Caprílico (Octanóico)	8	Em pequenas quantidades em muitas gorduras, especialmente aquelas de origem vegetal
Cáprico (Decanóico)	10	Detetado na gordura de leite de ruminantes
Láurico	12	Detetado na gordura de leite de ruminantes. Abundante em óleo de coco, óleo de palma
Mirístico	14	Abundante em óleo de palma, óleo de coco
Palmítico	16	Muito abundante em todas gorduras animais e vegetais. Produto primário da síntese de AG
Esteárico	18	Um dos AGS mais abundante na natureza. Produto final da biohidrogenação ruminal de AG polinsaturados C18
Araquídico	20	Óleo de amendoim (Araquis)
Seénico	22	Abundante em ceras
Lignocérico	24	Detetado em Cerebrosídeos, Óleo de amendoim

## Ácidos Gordos Insaturados

Os AG insaturados (AGI) podem ser subdivididos em monoinsaturados (AGMI) ou polinsaturados (AGPI), consoante apresentem 1 ou >1 dupla ligação ao longo da cadeia carbonada, respetivamente. Alguns exemplos de AGI e suas características estão apresentados na Tabela 2. A maioria dos AGI na natureza possuem duplas ligações de configuração *cis*, embora existam AG com duplas ligações de configuração *trans*, estes são produzidos no rúmen durante o processo de biohidrogenação dos AGPI ou gerados durante hidrogenações parciais durante o processamento dos óleos vegetais. Os AGI mais abundantes nos tecidos de origem animal e vegetal são compostos de cadeias com 16 ou 18 átomos de carbono, mas AG análogos com 10 a 36 átomos de carbono foram também encontrados na natureza na forma esterificada (Christie 2019).

**Tabela 2. Alguns exemplos e características de AGI de importância fisiológica e nutricional (Adaptado de Santana et al. 2017)**

Número de átomos de C e posição das duplas ligações	Séries	Nome comum	Nome sistemático	Ocorrência
Ácidos monoenólicos (uma dupla ligação)				
16:1c9	$\omega$ -7	Palmitoleico	c9-hexadecenóico	Em quase todas as gorduras
18:1c9	$\omega$ -9	Oleico	c9-Octadecenóico	Possivelmente o AGI mais comum nas gorduras naturais
18:1t9	n.a.	Elaídico	t9-octadecenóico	Gordura hidrogenadas e de ruminantes
22:1c13	$\omega$ -9	Erúcico	c13-Docosenóico	Óleos de sementes de colza e mostarda
24:1c15	$\omega$ -9	Nervónico	c15-Tetracosenóico	Nos cerebrosídeos
Ácidos dienólicos (2 duplas ligações)				
18:2c9c12 (18:2n-6)	$\omega$ -6	Linoleico	c9,12-Octadecadienóico	Milho, Amendoim, Algodão, Soja e Outros óleos de plantas
Ácidos trienólicos (3 duplas ligações)				

18:2c6c9c12 (18:3n-6)	$\omega$ -6	$\alpha$ -Linolenico	c6,9,12- Octadecatrienóico	Algumas plantas: Ex: Óleo de Prímula
18:3c9c12c15 (18:3n-3)	$\omega$ -3	$\alpha$ -Linolenico	c9,12,15- Octadecatrienóico	Abundante no óleo de linhaça
Ácidos Tetraenóicos (4 duplas ligações)				
20:4c5c8c11c14 (20:4n-6)	$\omega$ -6	Araquidónico	c5,8,11,14- Eicosatetraenóico	Encontrado em gorduras animais e no óleo de amendoim; importante componente de fosfolípidos dos animais
Ácidos Pentaenóicos (5 duplas ligações)				
20:5c5c8c11c14c17 (20:5n-3; EPA)	$\omega$ -3	Timnodónico	c5,8,11,14,17- Eicosapentanóico	Abundante em óleos de peixes e microalgas (Óleo de fígado de bacalhau, cavala, arenque e salmão)
22:5c7c10c13c16c19 (22:5n-3; DPA)	$\omega$ -3	Clupanodónico	c7,10,13,16,19- Docosapentaenóico	Óleo de peixe, Fosfolípidos do cérebro
Ácidos Hexaenóicos (6 duplas ligações)				
22:6c4c7c10c13c16c19 (22:6n-3; DHA)	$\omega$ -3	Cervónico	c4,7,10,13,16,19- Docosaheptaenóico	Óleo de peixe, Fosfolípidos do cérebro

n.a. – não aplicável

Os lípidos de todos os organismos superiores contêm quantidades estimáveis de AGPI com duplas ligações interrompidas por grupos metileno, isto é, com duas ou mais ligações duplas de configuração *cis* separadas por um único grupo metileno. Este número de duplas ligações nas plantas raramente excede três, mas em algas e animais pode atingir até seis (e com pouca ocorrência em alguns organismos marinhos). Nas plantas ocorrem duas famílias principais de AGI, chamados de essenciais para os animais, uma vez que estes não os conseguem sintetizar endogenamente, são eles o ácido linoleico (18:2n-6) e o ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3) (Christie 2019). Estes têm um papel fundamental no bom desenvolvimento e funcionamento do organismo, uma vez que são precursores de eicosanóides ou outros AGPI imprescindíveis ao organismo dos animais. Uma relevante quantidade de AGPI não interrompidos por grupos metileno

podem também ser encontrados em tecidos de ruminantes (resultantes da bioidrogenação ruminal, como discutido em Bessa et al. (2015) ou em invertebrados marinhos (Monroig and Kabeya 2018).

Os AG livres ou não esterificados são omnipresentes mesmo em quantidades pequenas em todos os tecidos vivos. Nos animais, grande parte dos lípidos da dieta são hidrolisados em AG livres no intestino antes de serem absorvidos e utilizados para a síntese de lípidos. No caso particular dos ruminantes, os lípidos são hidrolisados no rúmen, como será explicado na secção 2.3.2. Após serem absorvidos na mucosa intestinal, os AG são armazenados no tecido adiposo em triacilgliceróis e libertados no plasma onde andarão em circulação até serem transportados para os tecidos alvo. Níveis elevados de AG livres no plasma são apontados como a causa da inibição da ação anti lipolítica da insulina, aumentando ainda mais a taxa de libertação na circulação. E a natureza dos AG libertados também é importante, pois o ácido palmítico é geralmente visto como prejudicial, enquanto o ácido oleico pode ser benéfico à saúde (Christie 2019).

### 2.1.2. Triacilgliceróis

As moléculas de triacilgliceróis são ésteres de AG, nos quais três AG combinam-se com uma molécula do álcool glicerol (Figura 2). Os AG nas posições sn-1, sn-2 e sn-3 de acordo com a projeção de Fisher, podem variar quer no tamanho da cadeia quer no numero de insaturações. Quase todas as gorduras e óleos comercialmente importantes de origem animal e vegetal consistem principalmente em triacilgliceróis, de classe lipídica simples ou lípidos neutros, porque não têm carga elétrica (denominados "triglicéridos" na literatura mais antiga) (Lehninger 1997).

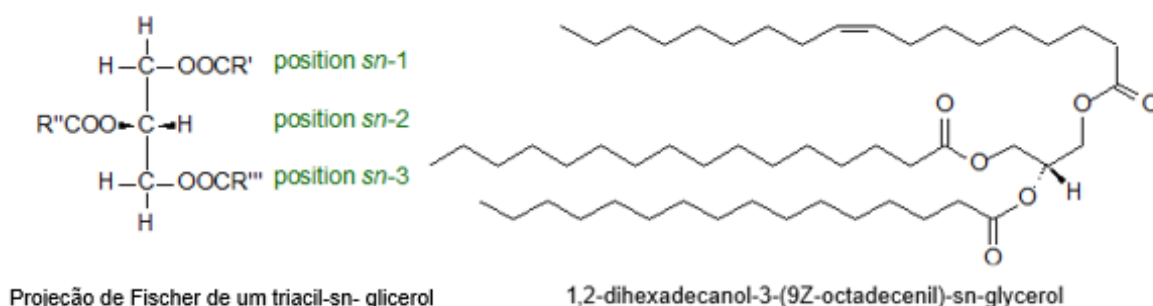


Figura 2. Triacilgliceróis (adaptado de Christie 2018).

Na natureza, os triacilgliceróis são sintetizados por sistemas enzimáticos, que determinam que um centro de assimetria é criado sobre o carbono-2 do esqueleto de glicerol, de modo que eles existem em formas enantioméricas, ou seja, com diferentes AG em cada posição (Christie 2018). A Tabela 3 apresenta a distribuição estéreo específica dos AG mais abundantes nos triacilgliceróis de 3 óleos utilizados na alimentação animal (Adaptado de Gao et al. 2017).

**Tabela 3. Distribuição dos principais triacilgliceróis (% total de TGL) nos óleos de girassol, milho e soja (adaptado de Gao et al. 2017).**

TGL	Óleo		
X-Y-Z <sup>1</sup>	Girassol	Milho	Soja
MLL	0,81 ± 0,14	0,28 ± 0,09	0,76 ± 0,09
LnLLn	n.d.	n.d.	3,77 ± 0,46
LnLL	n.d.	2,44 ± 0,44	7,77 ± 0,86
OPoL	0,8 ± 0,38	n.d.	n.d.
LLL	9,84 ± 1,08	12,23 ± 1,03	8,72 ± 0,98
PLL	5,44 ± 0,56	9,03 ± 1,11	6,08 ± 0,65
OLL	10,73 ± 1,27	13,52 ± 1,25	9,02 ± 0,5
OPL	4,59 ± 0,79	9,57 ± 0,94	6,7 ± 0,36
OOL	10,77 ± 1,14	12,5 ± 0,83	9,47 ± 0,59
POO	2,24 ± 0,75	5,66 ± 0,55	3,26 ± 0,54
OOO	9,1 ± 0,64	8,16 ± 0,24	n.d.
LSL	n.d.	n.d.	5,97 ± 0,21
PLS	2,32 ± 0,29	2,47 ± 0,29	3,36 ± 0,12
OSL	8,08 ± 0,25	6,51 ± 0,72	8,22 ± 0,27
SPO	1,21 ± 0,13	2,04 ± 0,28	2,07 ± 0,13
OOS	4,21 ± 0,25	3,24 ± 0,48	4,77 ± 0,43

<sup>1</sup>X-Y-Z, representa a estrutura do triacilglicerol, ou seja, o AG que está ligado na posição sn-1, sn-2 e sn-3 do glicerol. Em que: L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico, M: ácido mirístico, O: ácido oleico, P: ácido palmítico, Po: ácido palmitoleico, S: ácido esteárico. Abreviaturas: n.d., não detetado.

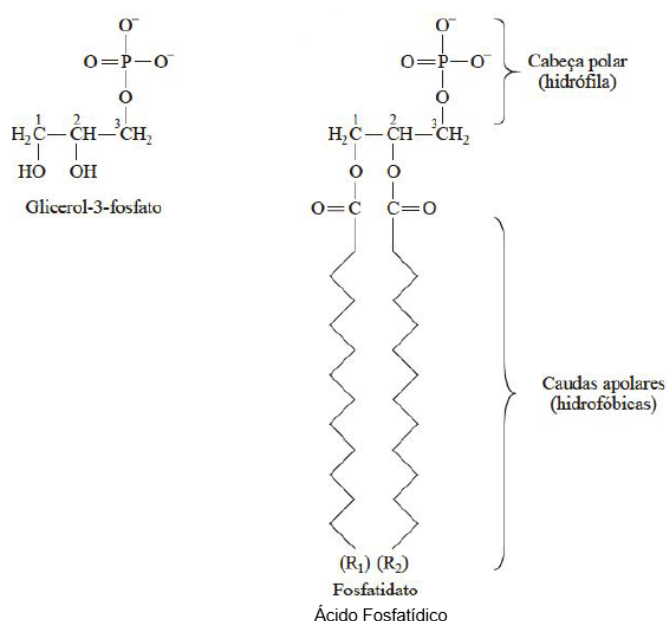
A fluidez de um triacilglicerol depende da natureza de suas cadeias de AG, em que quanto mais insaturado o triacilglicerol, mais fluida sua estrutura. Os triacilgliceróis encontrados nos tecidos animais tendem a ter mais AGS do que aqueles encontrados em plantas (Courtney 2017).

Atualmente a utilização de processos de interesterificação de óleos ou gorduras é cada vez mais utilizado na indústria alimentar como forma de diminuir a quantidade de AG *trans* originada pela hidrogenação parcial dos óleos vegetais (Mensink et al. 2016). Este processo consiste na substituição dos AG esterificados no glicerol por outros AG,

formando assim um novo triacilglicerol com nova distribuição estereo específica e novas propriedades físicas, químicas ou organoléticas (Zeitoun et al. 1993; List et al. 1995). As potencialidades da utilização de gorduras interesterificadas na alimentação animal, nomeadamente em ruminantes não foi ainda convenientemente explorada.

### 2.1.3. Fosfolípidos

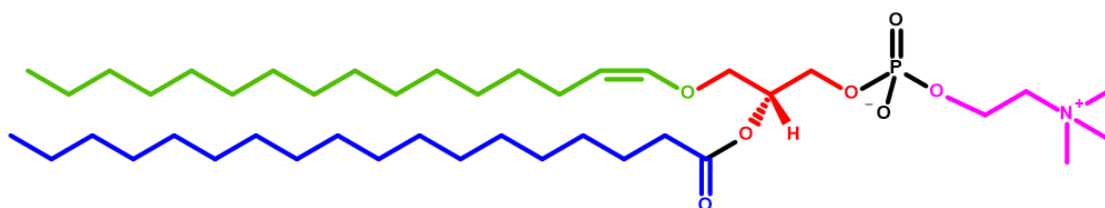
Os fosfolípidos são considerados lípidos polares, por serem moléculas anfipáticas, ou seja, contêm uma região polar hidrofílica e uma região apolar hidrofóbica (Figura 3). Esta característica permiti-lhes formar micelas em meio aquoso ao contrário dos lípidos neutros que não formam micelas devido a falta de cabeças polares. Existem muitos fosfolípidos considerados agentes emulsificantes (que diligenciam a dispersão coloidal de um líquido em outro) e agentes surfactantes (reduz a tensão superficial de uma solução) (Motta 2011).



**Figura 3. Exemplo de estrutura dos fosfolípidos (Adaptado de Santana et al. 2017).**

Os fosfolípidos encontram-se maioritariamente nas membranas celulares, nas lipoproteínas do plasma sanguíneo e em menor quantidade em depósitos de gordura (Lehninger 1997). Considera-se que os fosfolípidos são os constituintes que formam as membranas naturais, com diferentes fosfolípidos individuais com estados iónicos distintos que geram as suas localizações e funções dentro da bicamada (Christie 2018). Além disso, eles participam em inúmeros processos biológicos, por vezes, como

componentes integrantes dos complexos enzimáticos. Estruturalmente, os fosfolípidos são compostos por AG na posição sn-1 e sn-2 do glicerol e um grupo fosfato apolar na posição sn-3 do glicerol (Courtney 2017). Uma classe particular de fosfolípidos são os plasmalogénios, que são caracterizados por conterem um éter vinílico na posição sn-1 do glicerol em vez de um ácido gordo. As cadeias do éter vinílico mais comuns, são à semelhança dos AG, constituídas por 16 ou 18 átomos de carbono, no entanto é comum também apresentarem cadeias ramificadas com grupos metilo (Alves et al. 2013). Os plasmalogénios (Figura. 4), encontram-se nas membranas celulares e são bastante abundantes nalgumas bactérias anaeróbias (Goldfine 2017).



**Figura 4. Exemplo de um plasmalogénio (Plasmeniletanolamina), em que ligado ao glicerol (vermelho) contém: um éter vinílico C16:0 (verde), um ácido gordo saturado C18:0 (azul), e na cabeça polar contém uma etanolamina (rosa).**

Tendo em conta que os triacilgliceróis possuem em sua estrutura três moléculas de AG, enquanto que os fosfolípidos possuem duas moléculas, os AG são, os constituintes fundamentais da componente lipídica dos alimentos. Sendo que esses AG na forma livre são praticamente inexistentes nos alimentos (Sant'Ana 2004).

## 2.2. Importância dos lípidos

Os lípidos são componentes fundamentais da dieta alimentar dado ao seu elevado valor energético, são fonte de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e AG essenciais, como o ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolénico (Cabrita 2011). Os lípidos desempenham uma grande variedade de funções, desde componentes estruturais de membranas biológicas até moléculas de sinalização que afetam várias funções celulares. Muitas dessas funções estão relacionadas com as propriedades físico-químicas únicas compartilhadas por todas espécies de lípidos, isto é, a sua hidrofobicidade (Glatz 2014).

Os AG, são os componentes lipídicos presentes em maior quantidade nos alimentos e encontram-se esterificados maioritariamente na forma de triacilgliceróis e fosfolípidos. Estes compostos para além de reserva de energia têm uma importância fisiológica na manutenção das estruturas, funções, permeabilidade e integridade das membranas,



alterando o número de átomos de carbonos e de duplas ligações de um ácido gordo de acordo com as necessidades da membrana celular (Sant'Ana 2004). Os AG essenciais são também precursores da síntese dos eicosanóides que têm importantes funções biológicas tanto no animal como no Homem (Sant'Ana 2004). A maioria dos AG possuem assim importantes propriedades ou até mesmo vitais que são difíceis de serem substituídas.

A inclusão de suplementos lipídicos na dieta de ruminantes tem despertado mais atenção devido às vantagens proporcionadas por esses alimentos. Com a sua utilização aumenta-se a densidade energética, e pode-se beneficiar o perfil dos AG da carne e leite, pela redução da concentração dos AGS e aumento dos AGI (Carneiro et al. 2017). A suplementação lipídica é assim uma forma eficaz para responder às exigências energéticas e sua utilização pelo organismo do animal, no entanto este envolve um processo fisiológico complexo que irá definir o nível adequado de suplementação e os seus efeitos dependem da fonte utilizada (Carneiro et al. 2017).

Uma das principais fontes de energia na dieta dos ruminantes são os hidratos de carbono, mas estes são fermentáveis no rúmen. Parte da energia contida nesses hidratos de carbono é libertada pelo processo de fermentação no rúmen, sendo utilizada pelos microrganismos ruminais com consequente produção de calor. A libertação deste calor de fermentação contribui para aumentar a temperatura corporal do animal o que pode ser indesejável quando o animal se encontra sujeito a stresse calórico. Os lípidos ao contrário dos hidratos de carbono, não são fermentados no rúmen e não produzem calor. Dessa forma podem ser adicionados à dieta como estratégia na redução do stresse térmico, principalmente no verão, evitando-se problemas de acidose ruminal e balanço energético negativo especialmente no pós-parto e em casos de calor intenso (Burin 2016).

Em ruminantes, é conhecido que AG específicos produzidos no rúmen também desempenham um papel importante como moléculas sinalizadoras envolvidas na expressão de genes específicos e na regulação de processos metabólicos (Bauman et al. 2003). De uma forma específica, os isómeros de CLA desempenham diversas funções no organismo de acordo com a sua estrutura. Do conjunto de CLA, o 18:2*cis*-9, *trans*-11 é responsável pela inibição dos crescimentos de tumores, redução de doenças cardiovasculares e estímulo do sistema imune, enquanto que os isómeros 18:2*cis*-8, *trans*-10 e 18:2*trans*-10, *cis*-12 têm ação sobre determinadas enzimas responsáveis pela síntese de gordura na glândula mamária, reduzindo a sua produção e concentração no leite (Oliveira et al. 2004).

## 2.3 Metabolismo dos lípidos no rúmen

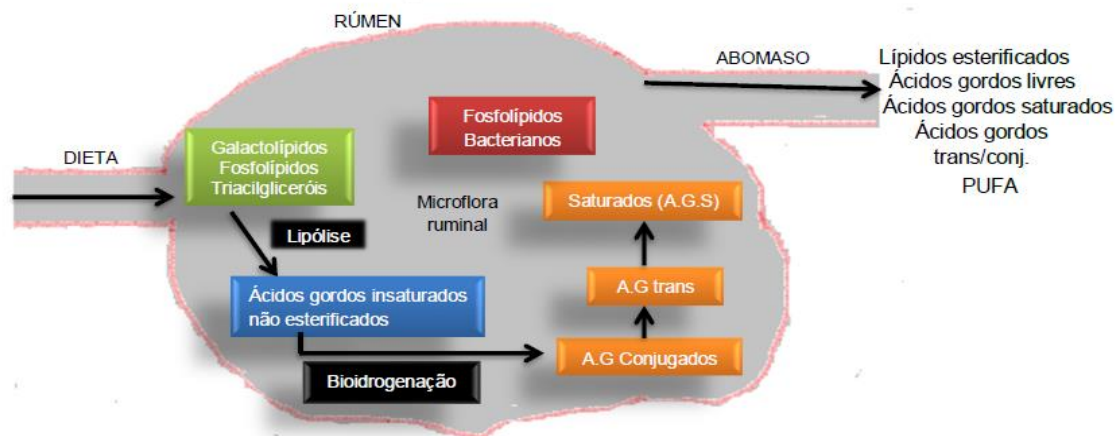
Os ruminantes possuem adaptações digestivas e metabólicas que fazem com que sejam animais altamente diferenciados, possuem uma grande relação de simbiose com a comunidade microbiana anaeróbica indispensável a todos os herbívoros para extrair energia das paredes celulares (Bessa 2019). Na dieta de ruminantes, os lípidos encontram-se sobretudo nas culturas forrageiras e nos concentrados adicionados à dieta na forma de grãos de cereais esmagados aos quais são adicionadas sementes de oleaginosas moídas ou seus extratos (Harfoot and Hazlewood 1997). Geralmente as dietas de ruminantes possuem entre 2 – 3% de lípidos na sua composição, dos quais aproximadamente metade são AG, e grande abundância de AGPI (Van Soest 1994; Kozloski 2011), como exemplificado na Tabela 4.

**Tabela 4. Composição em AG (% em peso para o total) dos lípidos da dieta, do rúmen total e das frações lipídicas do rúmen (adaptado de Harfoot e Hazlewood, 1997).**

Ácido gordo (AG)	AG no alimento	AG no rúmen total	Frações de lípidos no rúmen	
			AG livres	AG esterificados
14:0	4,41	2,64	0,97	4,24
16:0	21,48	21,85	23,02	26,5
16:1	1,74	2,11	2,76	Vestígios
18:0	5,01	22,75	48,08	23,94
18:1	5,98	11,35	13,06	14,85
18:2	14,26	11,38	5,67	6,4
18:3	38,46	4,13	-	0,97
Outros	8,66	23,79 <sup>1</sup>	6,62	23,10 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>esses valores aparentemente altos incluem uma ampla gama de AG individuais presentes nos lípidos complexos dos microrganismos do rúmen (adaptado de Viviani (1970) e Harfoot e Hazlewood (1997).

Em animais ruminantes, o rúmen é o principal local de hidrólise e biotransformação dos componentes da dieta, daí que a composição em AG da dieta seja distinta da composição em AG do rúmen total ou das frações de AG livres ou AG esterificados (Tabela 4). Isto é devido ao metabolismo microbiano, nomeadamente a hidrólise (lipólise) dos lípidos esterificados da dieta, a bioidrogenação dos AGI não esterificados e a síntese microbiana (Jenkins 1993; Jenkins et al. 2008). Estes processos são resumidamente ilustrados na Figura 5.



**Figura 5. Representação esquemática do metabolismo lipídico no rúmen.**

Assim, o metabolismo lipídico no rúmen é o principal responsável pelo complexo perfil de AG que fluem do rúmen quando comparado com a composição da dieta, afetando o perfil lipídico dos produtos dos ruminantes. Por sua vez, os AG gerados no rúmen, e absorvidos no intestino, podem por sua vez afetar o metabolismo dos lípidos nos tecidos, influenciando também a composição lipídica da carne e do leite (Marín et al. 2010). Devido a estes processos, os produtos derivados dos ruminantes são naturalmente ricos em compostos bioativos como o CLA-*cis*-9, *trans*-11, ácido vacénico (18:1*trans*-11) e AG conjugados do ácido linolénico (CLNA), mas também podem ser relativamente ricos em AG *trans* (i.e. 18:1*trans*-10) associados a um maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A produção destes AG no rúmen está intimamente ligada com a composição da dieta fornecida aos animais (Buccioni et al. 2012; Bessa et al. 2017).

### 2.3.1 Lipólise

Os lípidos da dieta, ao entrar no rúmen estão sujeitos à hidrólise por lípases microbianas ou em menor grau por lípases endógenas do alimento (Harfoot and Hazlewood 1997). A lipólise refere-se à libertação dos AG dos ésteres presentes nos lípidos dos alimentos (Marín et al. 2010). Geralmente os lípidos das fontes alimentares, são galactolípido, triacilgliceróis e fosfolípido, onde estão esterificados predominantemente AGI, que são intensamente metabolizados no rúmen (Jenkins 1993; Harfoot and Hazlewood 1997; Alves 2011; Bessa 2019). Dependendo da sua estrutura e das condições ruminais (pH, concentrações de cálcio e magnésio, tipo e quantidade de partículas), os AG libertados

durante a lipólise poderão ser saponificados, e adsorvidos nas partículas fortemente colonizadas por biofilmes (Bessa 2019).

Tanto a lipólise como a biohidrogenação são realizadas no rúmen pelo ecossistema microbiano composto maioritariamente por bactérias residentes. Apesar de haver mais de 50 anos de esforços de pesquisa nesta área, surpreendentemente pouco se sabe sobre a população microbiana responsável pela lipólise no rúmen (Jarvis and Moore 2010). O pH ruminal é um fator fundamental na lipólise, porque as principais bactérias responsáveis pela síntese de enzimas lipolíticas, possuem maior atividade a pH acima de 6,0 e nesta situação, a redução do pH inibe a lipólise (Jenkins 1993). Algumas das bactérias já conhecidas por serem responsáveis pelo processo de lipólise são a *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Propionibacter* (Jenkins 1993; Bauman et al. 2000; Alves et al. 2011). Para além do pH, outros fatores estão descritos de afetar a taxa e extensão da lipólise, como a utilização de antibióticos (ex. ionóforos) que impossibilitam a atividade e crescimento bacteriano (Jenkins 1993). Outros estudos indicam que as principais causas das alterações das taxas de lipólise são o grau de maturação do alimento volumoso, tamanho da partícula do alimento no rúmen e o teor de azoto (Bauman et al. 2000). Na Tabela 5 encontram-se apresentados alguns dos fatores descritos de afetar a hidrólise dos lípidos no rúmen.

Van Nevel e Demeyer (1996) no estudo sobre a influência do pH na lipólise e biohidrogenação de óleo de soja em estudos *in vitro* com inóculo ruminal, observaram que a pH menor que 6, a lipólise é baixa e a inibição da lipólise tornou-se maior à medida que o pH diminuiu. Verificaram ainda noutro estudo utilizando antibióticos, que a lipólise foi inibida entre 10 – 20%, e dentro dos inibidores estudados os mais relevantes foram os ionóforos e amoxicilina (Van nevel e Demeyer, 1995).

Gerson et al. (1985), num ensaio utilizando cinco carneiros castrados Romney, fistulados no rúmen e alimentados com dietas contendo proporções decrescentes de fibra (42,8-19,5%) e proporções crescentes de amido (12,2-31,7%) também constataram que as taxas de lipólise e hidrogenação diminuíram significativamente com o decréscimo do conteúdo de fibras, o que se refletiu nas quantidades de ácido esteárico e ácidos octadecenóicos na digesta ruminal. Os mesmos autores realizaram outro ensaio onde os carneiros fistulados no rúmen foram alimentados com dietas com alto teor de fibra e a digesta ruminal incubada na presença de 0, 0,15, 0,45, 0,75 e 1,50% de amido. As taxas de lipólise aumentaram, mas não se verificou nenhum efeito do amido na hidrogenação. Como conclusão deste estudo verificou-se que adição a curto prazo de energia aumenta a velocidade de lipólise e hidrogenação dos lípidos no rúmen.

**Tabela 5. Revisão de alguns estudos sobre a lipólise no rúmen.**

Substrato	Condições estudadas	Efeito na Lipólise	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Ref.
Óleo de soja (OS)	- pH (6,8; 6,3; 6,0; 5,6; 5,2) - 2 níveis OS (40 ou 80 mg)	- Diminuiu a pH <6 - Inibição > com 80 mg OS	<i>in vitro</i>	Van Nevel and Demeyer (1996)
Alimento composto + OS	- Antibióticos	- Diminui 10 – 20%	<i>in vitro</i>	Van Nevel and Demeyer (1995)
Feno	- Quantidade de OS (0, 2, 4, 6, 8, 10%) - Fonte de lípidos (10% OS vs 10% GA) - Tipo de dieta (2,3 kg C; 2,3 kg C + 0,35 kg OS; 5,9 kg C; 5,9 kg C + 0,35 kg OS)	- Diminui de 44%/h para 30%/h com aumento de OS - Diminuiu com GA comparado com OS - Não houve efeito do tipo de dieta	<i>in vitro</i>	Beam et al. (2000)
Trevo vermelho (TV)	- TV com ↑ atividade polifenoloxidase (PPO) vs TV com ↓ atividade PPO	- Diminui com aumento da atividade PPO	<i>in vitro</i>	Lee et al. (2007)
	- Megalac (Ca-PFAD <sup>1</sup> )	- Diminuiu 53%	<i>in vivo</i>	Moate et al. (2004)
	- Triacilgliceróis (óleo de linho)	- Hidrólise variou entre 62 e 87%	<i>in vitro</i>	Garton et al. (1961)
Especies Forrageiras	- <i>Vicia sativa</i> vs <i>Trifolium incarnatum</i> em 2 estados: vegetativo e reprodutivo	- Não houve efeito do estado vegetativo - Hidrólise foi mais baixa com a <i>Vicia sativa</i> (59,3% vs 74,8%)	<i>in vitro</i>	Cabiddu et al. (2010)

<sup>1</sup> Ca– PFAD, sais de cálcio de óleo de palma destilado

A presença de elevados níveis da enzima lipolítica, polifenoloxidase (PPO), existente em certas forragens, como o trevo vermelho, tem sido descrita como tendo um efeito inibidor da lipólise no rúmen (Lee 2014). A PPO é uma metaloproteína de cobre que funciona na presença de oxigénio, e que apesar de proteger a metabolização dos lípidos no rúmen até um máximo de 33% (Lee 2007), não está esclarecido o mecanismo pelo

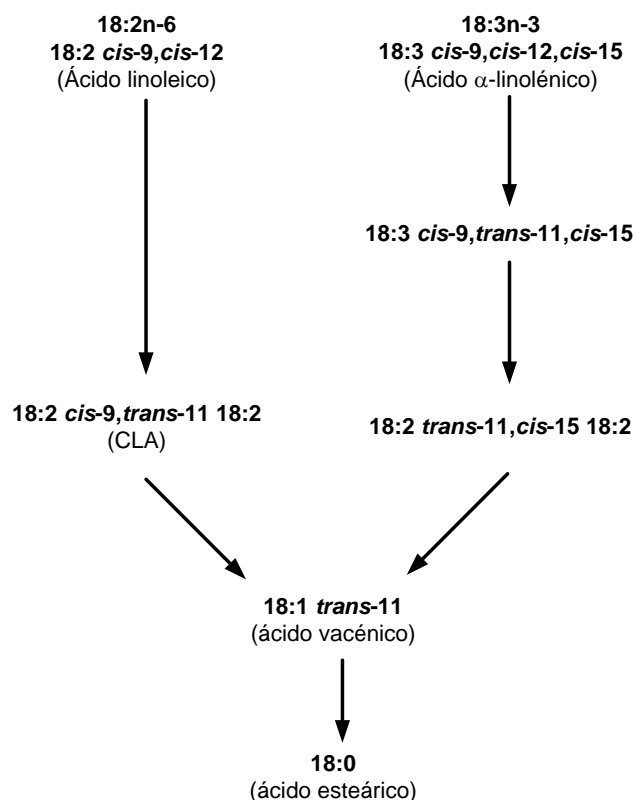
qual essa inibição ocorre (Buccioni et al. 2012; Lee 2014). Algumas das hipóteses propostas é a desativação de enzimas lipolíticas da planta, ou a formação de complexos proteína-fenol-lípido que inibem as lípases microbianas (Buccioni et al. 2012; Lee 2014). Segundo Beam et al. (2000), triacilgliceróis contendo AGI são hidrolisados pelas lípases ruminais para produzir AG livres, no entanto o grau de lipólise varia consideravelmente com a quantidade e fonte de lípidos adicionados à dieta, ao contrário das taxas iniciais de desaparecimento dos ácidos linoleico ou oleico no conteúdo ruminal. De facto, trabalho realizado por Beam et al. (2000) mostrou que a taxa de lipólise do óleo de soja diminuiu de 44%/h para menos de 30%/h com o aumento da percentagem de óleo de soja no meio de incubação de 2% para 10%. Outros autores estudaram o efeito do óleo de peixe na lipólise no rúmen, e concluíram que comparativamente com o óleo de soja, a lipólise do óleo de peixe diminuiu significativamente ao longo do tempo (Dohme et al. 2003).

Na maioria dos estudos sobre a lipólise utiliza-se, como fontes lipídicas, óleos vegetais ou óleos de origem animal, pelo que pouco se sabe sobre o efeito da estrutura dos triacilgliceróis, nomeadamente o tamanho da cadeia, o tipo de AG ligados ao glicerol, e número de insaturações na lipólise.

### 2.3.2 Biohidrogenação

A biohidrogenação é o processo que ocorre no rúmen de saturação dos AGI da dieta, geralmente ácidos C18 como o ácido oleico (18:1 *cis*-9), o linoleico (18:2 *cis*-9,*cis*-12 ou 18:2n-6) e  $\alpha$ -linolénico (18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 ou 18:3n-3) (Marín et al. 2010; Bessa, 2019). A hidrogenação completa dos ácidos linoleico e linolénico no rúmen está descrita de ser entre 95 e 60%, respetivamente (Doreau and Ferlay, 1994). Tanto a lipólise como a biohidrogenação são processos mediados por enzimas, no entanto a lipólise é um pré-requisito para que a biohidrogenação ocorra, assim é necessário que os AG sejam hidrolisados dos lípidos da dieta e se encontrem na forma livre para serem biohidrogenados (Jenkins et al. 2008).

O primeiro passo da biohidrogenação é a isomerização, ou seja, há uma modificação na configuração geométrica (de *cis* para *trans*) e na posição de algumas duplas ligações, formando outros intermediários. A redução das duplas ligações aumenta o grau de saturação dos AG até se formarem AG totalmente saturados como exemplificado na Figura 6 (Harfoot and Hazlewood 1997).



**Figura 6.** Vias principais de biohidrogenação do ácido linoleico e ácido α-linolênico no rúmen (adaptado de Harfoot and Hazlewood, 1997).

Pensa-se que as bactérias sejam as principais responsáveis pela biohidrogenação, enquanto a contribuição dos protozoários é considerada insignificante. Essa atividade está principalmente associada a bactérias ligadas às partículas, e não àquelas da fase líquida. Os AGI livres são adsorvidos nas superfícies das partículas do alimento e hidrogenados (Buccioni et al. 2012), essa hidrogenação poderá ser a forma de neutralizar o efeito tóxico que esses AGI exercem aos microrganismos ruminais (Maia et al. 2010).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm revelado uma grande variedade de isômeros *trans*-18:1, 18:2 e CLA presentes no conteúdo da digesta de bovinos e ovinos. O que revela a existência de muitos intermediários produzidos no rúmen pelas vias de biohidrogenação dos AGPI (Jenkins et al. 2008). De acordo com a maioria dos estudos da biohidrogenação, o ácido linolênico é transformado inicialmente em 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 por microrganismos ruminais, que é subsequentemente hidrogenado em 18:2 *trans*-11, *cis*-15 não-conjugado, enquanto que o ácido linoleico é isomerizado formando o CLA-*cis*-9, *trans*-11 (Figura 6). Evidentemente, existem muitas vias de biohidrogenação e muitos fatores que interferem neste processo relacionados principalmente o tipo de dieta do animal e ambiente ruminal. Assim podem ser encontrados no rúmen, e nos

produtos derivados dos ruminantes, numerosos AG intermediários produzidos durante a biohidrogenação ruminal para além dos exemplificados na Figura 6 (Bauman et al. 2003). De facto, estudos de incubações *in vitro* com isótopos estáveis dos ácidos linoleico e linolénico com microrganismos ruminais demonstraram a formação de um elevado número de ácidos gordos C18 com vários graus de insaturação e isomerização (Jenkins et al. 2008).

São várias as bactérias que têm vindo a ser identificadas no rúmen, no intestino de mamíferos ou culturas lácteas com alguma capacidade de isomerizar e hidrogenar os AGPI. Estas incluem certas estirpes de *Butyrivibrios*, *Ruminococcus*, *Eggerthella* (antes designadas por *Eubacterium*), *Borrelia*, *Propionibacterium*, *Treponema*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Clostridium* e *Lactobacillus*. Contudo, apenas muito poucas estirpes (todas filogeneticamente relacionadas com género *Butyrivibro*) são conhecidas ainda de ter a capacidade de hidrogenar os AGI completamente até 18:0 (Lourenço et al. 2010; Bessa 2019).

Assim, é o processo de biohidrogenação que ocorre no rúmen que vai determinar em grande medida a composição em AG dos produtos dos ruminantes, e é por essa razão que a gordura de ruminantes é naturalmente rica em CLA, conhecido de ser um AG bioativo (Bauman et al. 1999). São vários os fatores conhecidos por afetarem o padrão de biohidrogenação no rúmen e os produtos depositados na gordura de ruminantes, estes incluem o rácio entre forragem e alimento composto, o nível e tipo de suplemento lipídico, pH ruminal e ionóforos (Bessa et al. 2000). As taxas de hidrogenação variam também com a qualidade de forragem (estágio de maturação e conteúdo de N), área superficial de partículas de ração no rúmen e modificações estruturais das moléculas lipídicas que inibem o ataque por bactérias isomerases (Jenkins 1993).

Várias estratégias têm sido utilizadas para modificar ou melhorar a composição em AG da gordura de ruminantes tendo em conta o processo de biohidrogenação que ocorre no rúmen. Dentro dessas estratégias encontram-se a utilização de forragens melhoradas, extratos de plantas, óleos vegetais, ou óleos de origem marinha, por exemplo (Scollan et al. 2017).

### **2.3.3. Síntese microbiana**

O metabolismo dos lípidos no rúmen inclui não só o processo de lipólise e biohidrogenação dos lípidos da dieta, mas também a síntese de novo de lípidos celulares microbianos. No rúmen, os AG gerados durante a lipólise, encontram-se maioritariamente adsorvidos às partículas do alimento através de interações



hidrofóbicas. Esta adsorção pode influenciar o metabolismo lipídico das populações das bactérias do rúmen, uma vez que existem bactérias associadas à fase líquida (BAL) e bactérias associadas à fase sólida (BAS). Estas populações diferem no teor em lípidos e na composição em AG, sendo que a proporção é mais baixa nas BAL do que nas BAS (Bauchart et al. 1990).

Os lípidos microbianos podem ser originados por fontes exógenas (por captação de lípidos/AG presentes ou formados no rúmen) ou sintetizados de novo (Harfoot and Hazlewood 1997). Os AG sintetizados de novo pelos microrganismos do rúmen consistem essencialmente em AGS e AGMI de cadeia C16 e C18 (Fulco 1983), e também AG ramificados (Vlaeminck et al. 2006).

Três séries de AG ramificados podem ser distinguidas de acordo com o precursor utilizado na sua síntese, especificamente, os AG de cadeia ímpar da série iso (iso-15:0 e iso-17:0), AG ramificados de cadeia ímpar da série anteiso (anteiso-15:0 e anteiso-17:0), e AG de cadeia par da série iso (iso-14:0 e iso-16:0), que utilizam para a sua síntese os precursores 2-metilbutirato, 3-metilbutirato ou 2-metilpropionato (isobutirato), respetivamente (Vlaeminck et al. 2006). Estes precursores derivam da desaminação e descarboxilação oxidativa dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, respetivamente (Fulco 1983). Devido ao fato de estes AG ramificados serem de origem microbiana, a composição em AG ramificados tem sido utilizada como ferramenta de diagnóstico da função ruminal bem como marcadores microbianos internos do ecossistema ruminal (Vlaeminck et al. 2006).

Como apresentado na Tabela 6, as bactérias celulolíticas contêm grandes quantidades de AG ramificados da série iso, com *Ruminococcus flavefaciens* a atingir cerca de 35,7% do iso-15:0 e *Ruminococcus albus* a conter 20,6% de iso-14:0. Também *Prevotella* contém 36,7% de anteiso-15:0. Ao contrário as bactérias amilolíticas, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Succinimonas amylolytica*, *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium* e *Streptococcus bovis* apresentam níveis baixos de AG de cadeia ramificada. Assim, a composição em AG ramificados poderá ser utilizada como indicador da composição microbiana no rúmen, ou sugerir mudanças dessa mesma população microbiana.

**Tabela 6. Composição em ácidos gordos ramificados e cadeia ímpar (g/100g total AG) de algumas bactérias ruminais (adaptado de Vlaeminck et al. 2006).**

	Anteiso (ímpar)			Iso (par)			Iso (ímpar)		Linear (ímpar)		
	13:0	15:0	17:0	13:0	15:0	17:0	14:0	16:0	13:0	15:0	17:0
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	-	2,3	2,9	-	35,7	5,2	2,5	7,3	0,1	3,2	0,5
<i>Ruminococcus albus</i>	-	9,4	1,3	-	-	0,7	20,6	11,0	-	10,3	1,4
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	3,9	7,7	1,2	-	0,1	0,2	3,6	3,4	9,0	30,2	2,1
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	6,4	16,2	8,6	6,8	10,4	5,7	10,8	11,1	2,9	7,8	4,2
<i>Prevotella</i>	1,2	36,7	4,2	3,0	14,7	2,3	3,3	3,0	1,2	12,1	1,2
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	0,8	3,6	1,0	-	0,1	-	0,6	1,5	0,5	4,0	0,7
<i>Succinimonas amylolytica</i>	-	-	-	-	52,6	10,8	1,6	5,3	1,6	5	-
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	1,1	-	-	-	-	-	-	0,5	1,1	0,3
<i>Selenomonas ruminantium</i>	-	0,1	-	-	0,2	-	0,3	0,1	1,3	6,0	2,9
<i>Streptococcus bovis</i>	-	0,9	-	-	-	-	0,4	0,2	0,6	1,7	1,2
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	2,8	-	0,1	0,2	0,2	1,5	0,5	1,5	6,0	4,5
<i>Lachnospira multiparus</i>	-	4,0	2,6	-	1,1	1,1	1,2	1,8	2,9	0,8	0,1

Os AG voláteis precursores dos AG ramificados podem também ser utilizados na síntese de éteres vinílicos presentes na cadeia sn-1 dos plasmalogénios (Figura 4), que são uma classe de fosfolípidos particularmente abundante nas membranas das bactérias anaeróbias (Allison et al. 1962; Wegner and Foster 1963). Estes éteres vinílicos são usualmente analisados na forma de dimetil acetais (DMA), gerados durante a preparação dos AG na forma de ésteres metílicos (Alves et al. 2013). Assim o tamanho e estrutura da cadeia dos éteres vinílicos, à semelhança dos AG ramificados, apresenta maioritariamente cadeias iso e anteiso (Miyagawa 1982). Por esse motivo, e considerando a ausência de plasmalogénios nos alimentos, também a composição em DMA do rúmen poderá ser utilizada para identificar mudanças na população microbiana ruminal, como sugerido por vários autores (Saluzzi et al. 1995; Alves et al. 2013; Cremonesi et al. 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **a) OBJETIVO GERAL**

Avaliar a lipólise de diferentes triacilgliceróis através de estudos *in vitro* com inóculo ruminal

#### **b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obter resultados exploratórios sobre a hidrólise de lípidos estruturados no rúmen.
- Avaliar o efeito do comprimento da cadeia e grau de insaturação dos ácidos gordos no triacilglicerol na resistência à lipólise
- Avaliar o efeito dos diferentes triacilgliceróis na bioidrogenação ruminal ácidos gordos
- Avaliar o efeito dos diferentes triacilgliceróis na fração dos fosfolípidos do rúmen como indicador de alterações na população microbiana

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento experimental

Para estudar a lipólise de triacilgliceróis com diferentes tamanhos de cadeia dos AG e diferentes graus de insaturação dos AG ligados ao glicerol, foram utilizados 5 triacilgliceróis comerciais (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com idênticos AG nas 3 posições do glicerol:

	Triacilglicerol (TGL)	Referência	Abreviação
1)	TGL(16:0/16:0/16:0)	T5888	TGL-16:0
2)	TGL(18:0/18:0/18:0)	T5016	TGL-18:0
3)	TGL(18:1c9/18:1c9/18:1c9)	T7140	TGL-18:1c9
4)	TGL(18:2n-6/18:2n-6/18:2n-6)	T9517	TGL-18:2n-6
5)	TGL(18:3n-3/18:3n-3/18:3n-3)	T6513	TGL-18:3n-3

A experiência foi realizada em triplicado (3 semanas independentes), e em cada experiência foram estudados 5 tempos de incubação (0, 0,5, 2, 4 e 6 horas), com tubos (fermentadores) individuais para cada tempo de incubação. Paralelamente, foram incubados tubos nas mesmas condições, mas sem a adição de qualquer triacilglicerol (controlo).

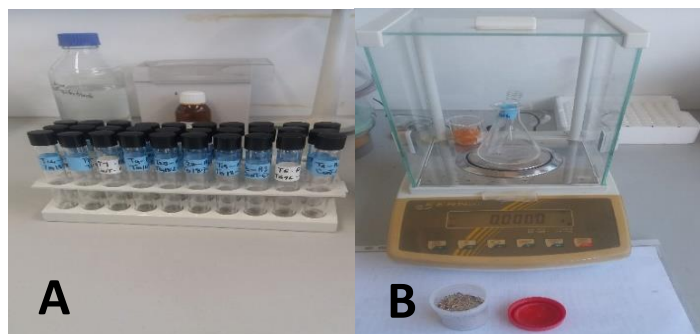
### 4.2. Incubação *in vitro*

As incubações foram efetuadas no Laboratório de Sistemas de Produção Animal (CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa), no período da manhã, com o procedimento para incubações *in vitro* com suco de rúmen utilizando o tampão de Goering e Van Soest, 1970 (Anexo 1). De acordo com os procedimentos descritos nos pontos que se seguem.

#### 4.2.1. Pesagem das amostras:

Este procedimento realizou-se na véspera do dia da incubação. Identificou-se e tirou-se as taras dos tubos (16 mL) de incubação. Numa balança analítica (Kern AEJ, Balingen, Alemanha) pesou-se 60 mg de alimento diretamente no tubo, a composição do alimento

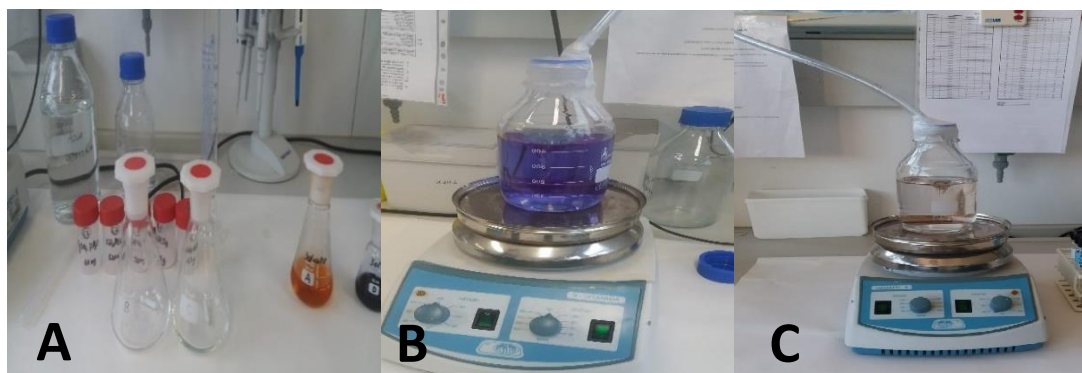
encontra-se descrita em Guerreiro et al. (2016). Também foi adicionado 3 mg de cada um dos padrões de lípidos a estudar (Figura 7).



**Figura 7. Identificação dos tubos de incubação (A) e pesagem de 60 g de alimento diretamente no tubo (B).**

#### 4.2.2. Preparação da solução tampão:

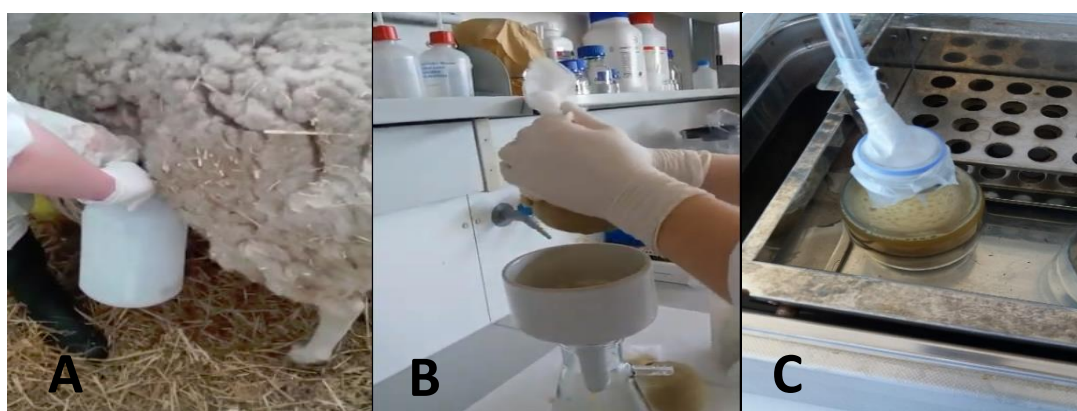
Foi preparada a solução tampão de Goering e Van Soest, para isso preparam-se cinco soluções individuais de acordo com as tabelas anexas ao método, nomeadamente: solução micromineral (A), solução tampão (B), solução micromineral (C), solução redutora (E) e a Resazurina 0.1 % (w/v) (D). Na véspera do dia das incubações adicionou-se 50  $\mu$ L de solução (A) a 200 mL de água destilada e agitou-se com ajuda do agitador, adicionou-se 100 mL de solução (B), 100 mL de solução (C), 0,5 mL de resazurina (D) e 3 mL de solução (E) e agitou-se. Deixou-se saturar durante a noite em corrente de  $\text{CO}_2$ , visível com a passagem de cor azul para incolor (Figura 8).



**Figura 8. Preparação da solução tampão (A) e saturação com  $\text{CO}_2$  durante a noite até passagem de cor azul (B) a incolor (C).**

#### 4.2.3. Preparação do inóculo ruminal

Recolheu-se o conteúdo ruminal de uma borrega fistulada no rúmen para um frasco previamente aquecido a 39 °C. O frasco foi imediatamente levado para o laboratório e filtrou-se o conteúdo ruminal por quatro camadas de gases com um funil de porcelana para um kitazato de 2 L. De seguida retirou-se 100 mL do conteúdo ruminal e adicionou-se rapidamente a 400 mL de solução tampão saturada com CO<sub>2</sub> em banho a 39 °C, esta etapa efetuou-se no mínimo de tempo possível para evitar que o fluido ficasse exposto ao oxigénio. No final registou-se o pH (J.P Selecta, Barcelona, Espanha) do conteúdo ruminal e do inóculo ruminal diluído (Figuras 9).



**Figura 9. Procedimento de colheita do conteúdo ruminal de uma ovelha fistulada (A), filtração (B), diluição e saturação com CO<sub>2</sub> (C).**

#### 4.2.4. Incubação

Adicionou-se 6 mL do inóculo ruminal a cada tubo para incubação com 60 mg de alimento e 3 mg de lípidos previamente preparado sempre na presença de CO<sub>2</sub> e com agitação como descrito anteriormente. A adição do inóculo a cada tubo foi feita aleatoriamente, assim como a posição dos tubos no banho a 39 °C. A aleatorização foi feita a partir da aplicação online random.org. As incubações tiveram a duração de 0h, 0,5h, 2h, 4h e 6h de modo a estudar a evolução da hidrólise dos lípidos ao longo do tempo. Ao final de cada tempo de incubação os tubos foram colocados diretamente numa arca congeladora a -20 °C. As amostras foram posteriormente liofilizadas (Scavanc CoolSafeT, Lynge, Dinamarca) durante três dias para posterior extração dos lípidos.

### 4.3. Análise das amostras

#### 4.3.1. Extração de lípidos

Para efetuar-se a extração dos lípidos do conteúdo ruminal liofilizada resultante das incubações *in vitro* usou-se o método adaptado de Honkanen et al. (2016), apresentado no Anexo II.

Antes da extração, pesou-se em balança analítica, todos os tubos após liofilização para saber as quantidades de matéria seca das amostras (Figuras 10). Adicionou-se a cada tubo 500 µL de água destilada e 4 mL de hexano:isopropanol (3:2, v/v), agitou-se em vortex (Heidolph Reax top, Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Alemanha) e adicionou-se 200 µL de solução HCl 1M, voltou-se a agitar e verificou-se se o pH estava ácido com papel indicador, e posteriormente centrifugou-se. De seguida retirou-se a fase superior com cuidado e colocou-se no novo tubo de ensaio. Adicionou-se novamente 4 mL de hexano:isopropanol ao resíduo inferior que ficou do passo anterior, agitou-se novamente e centrifugou-se, retirou-se a fase superior e colocou-se no mesmo tubo anterior, centrifugou-se e transferiu-se a fase líquida para um novo e evaporou-se o solvente dos tubos em corrente de azoto a 37 °C (Liebisch GmbH & Co, Bielefeld, Alemanha).

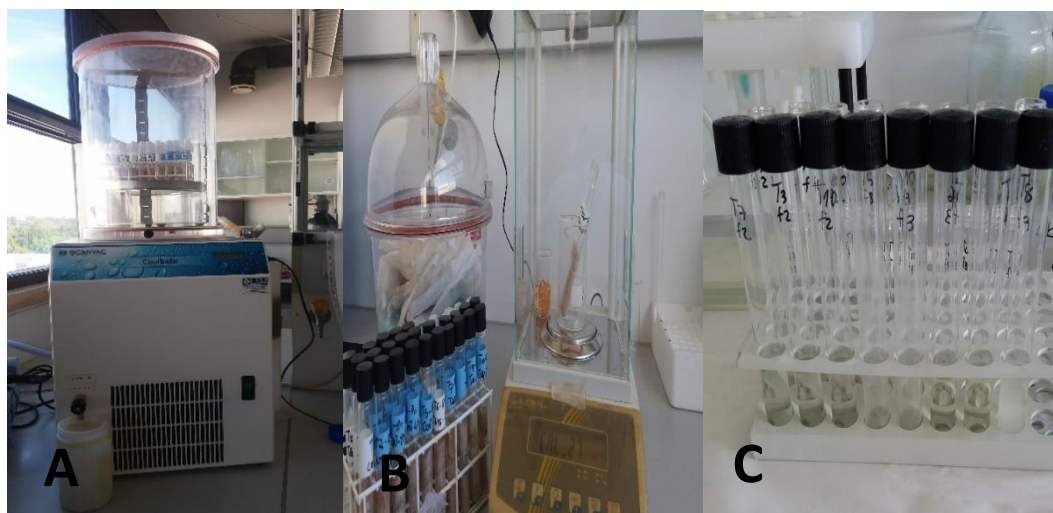
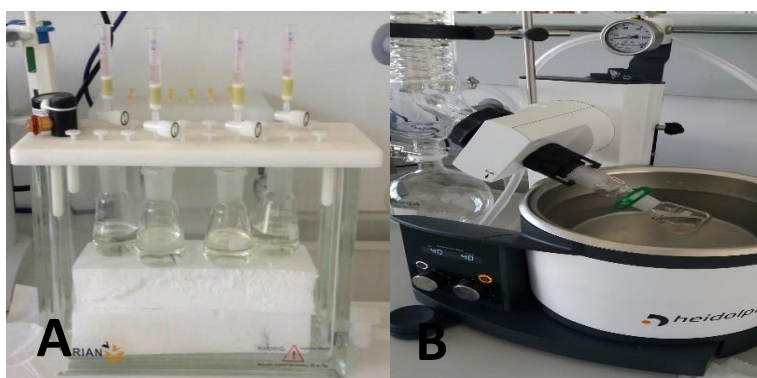


Figura 10. Liofilização das amostras (A), pesagem (B) e extração dos lípidos (C).

#### 4.3.2. Separação das frações lipídicas por extração em fase sólida (SPE)

A separação de classes lipídicas (Triacilgliceróis, AG-livre, e Fosfolípidos) efetuou-se através do método adaptado de Ruizet al. (2004), Kaluz et al. (2000), e Kim et al. (1990), como apresentado no Anexo III. Para a separação utilizou-se um sistema de vácuo para extração em fase sólida (SPE) “SPE vacuum manifold” (Phenomenex, Alcobendas, Espanha) (Figura 11), e equilibrou-se a coluna de SPE com 4 mL de hexano. De seguida, dissolveu-se o extrato lipídico (20 mg) em 1 mL de diclorometano e aplicou-se na coluna. Eluiu-se com 2 mL de hexano para recolha dos ésteres do colesterol, colocou-se um novo tubo e eluiu-se com 5 mL de diclorometano para recolha dos triacilgliceróis, colocou-se outro tubo e eluiu-se com 5 mL de éter dietílico:ácido acético para recolha de AG livres e colocou-se um novo tubo e eluiu-se com 10 mL de metanol para recolha da fração de fosfolípidos. Após estas separações evaporou-se os solventes de todas as frações em evaporador rotativo (Heidolph Hei-Vap, Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Alemanha) (Figura 18) e dissolveu-se o conteúdo de cada erlenmeyer em tolueno para posterior transesterificação.



**Figura 11. Separação das frações lipídicas por SPE (A) e evaporação do solvente (B).**

#### 4.3.3. Transesterificação

A formação dos AG na forma de ésteres metílicos das frações lipídicas dos Triacilgliceróis, AG-livres e Fosfolípidos efetuou-se a partir do método de transesterificação direta, adaptado de Alves et al. (2013) como apresentado no anexo IV.

A cada extrato lipídico adicionou-se 1 mL de tolueno seco e 1 mL de padrão interno (19:0, de concentração 1 mg/mL), adicionou-se 2 mL de solução de metóxido e sódio em metanol 0,5 M e agitou-se no vortex durante 10 segundos, de seguida colocou-se em banho de água a 50 °C durante 15 min e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Após o arrefecimento adicionou-se 3 mL de solução HCl/metanol e agitou-se



no vortex, colocou-se novamente no banho de água a 80 °C com agitação durante 20 minutos e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Após este segundo banho, adicionou-se 2 mL de solução K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (em duas porções de 1 mL) e 2 mL de n-hexano, agitou-se em vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 min. Depois recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo que já continha 0,5 g de sulfato de sódio anidro para remoção de água, agitou-se o tubo para homogeneizar em vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 min. Posteriormente retirou-se a fase de hexano que continha os ésteres metílicos para um novo tubo e evaporou-se em corrente de azoto a 37 °C, ao resíduo evaporado adicionou-se 1 mL de n-Hexano p/GC e colocou-se num vial de GC. Os vias foram armazenados a -20 °C até análise por cromatografia gasosa.

#### 4.3.4. Análise por cromatografia gasosa (GC)

Os AG na forma de ésteres metílicos foram separados e quantificados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID) (Figura 12). Para isso utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu 2010-Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida, SP-2560 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As condições do GC foram as seguintes: a temperatura do injetor e o detetor foram mantidos a 220 °C e 250 °C, respetivamente; utilizou-se hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0 mL/min e foi injetada 1 µL de amostra com um split ratio de 1:10. O forno foi programado para iniciar a uma temperatura de 50 °C que foi mantida durante 1 min, seguidamente a temperatura subiu até aos 150°C a uma velocidade de 50°C/min, e esta temperatura foi mantida durante 20 min, posteriormente a temperatura subiu até aos 190 °C a uma velocidade de 1 °C/min, e por fim a temperatura subiu até aos 220 °C a uma velocidade de 2 °C/min onde foi mantida durante 118 min, perfazendo um tempo total de 118 min. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção com misturas de padrões disponíveis comercialmente, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) de acordo com Alves et al. (2013).



**Figura 12. Análise por GC-FID.**

#### 4.3.5. Cálculos e Análise Estatística

A lipólise foi avaliada pelo desaparecimento dos AG de cada um dos triacilgliceróis estudado na fração dos lípidos neutros, entre as 0, 0,5, 2, 4 e 6 horas de incubação de acordo com a seguinte expressão:

$$Desaparecimento (\%) = \frac{[AG_{TGL_i}(\text{tempo } 0)] - [AG_{TGL_i}(\text{tempo } t)]}{[AG_{TGL_i}(\text{tempo } 0)]} \times 100$$

Onde: AG<sub>TGL<sub>i</sub></sub> é a quantidade do AG do respetivo TGL testado, expressa em mg, ao tempo 0 e aos tempos t (t = 0,5, 2, 4 e 6 horas).

Os dados foram analisados utilizando o Proc MIXED do SAS considerando cada repetição da incubação *in vitro* (“run”) como bloco aleatório (“random block”). Numa primeira análise os dados obtidos a cada hora foram analisados de forma independente, considerando apenas o tipo de TGL como efeito fixo.

Complementarmente, para cada tipo de TGL foi estudado de forma independente o efeito do tempo de incubação nos diversos AG das frações lipídicas. O tempo foi tratado como variável categórica e a “run” como bloco aleatório.

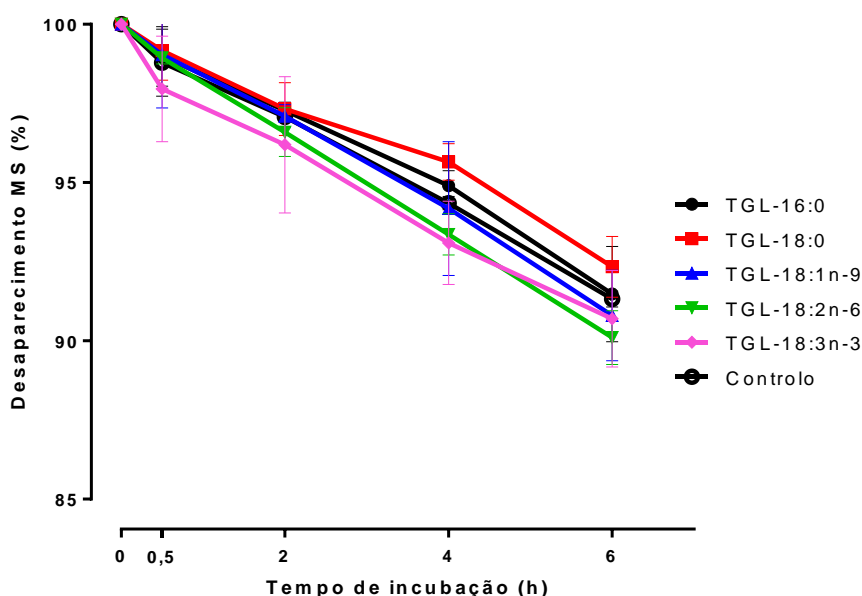
Em ambos os modelos quando se detetaram efeitos significativos as diferenças entre médias foram determinadas utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram considerados efeitos significativos quando P<0,05 ou tendências quando P<0,1.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Desaparecimento da matéria seca

O gráfico 1 mostra o desaparecimento de matéria seca (MS) dos conteúdos incubados após 0,5, 2, 4 e 6 horas de incubação *in vitro* com os 5 triacilgliceróis testados e o controlo (sem adição de TGL). O desaparecimento da matéria seca variou entre 90 – 93% ao fim das 6 horas de incubação. Não se observaram diferenças significativas entre os vários TGL e o controlo, verificando-se, no entanto, menores valores numéricos de desaparecimento de matéria seca nas incubações com o TGL-18:2n-6, e maiores com o TGL-18:0.

**Gráfico 1 - Desaparecimento (%) de matéria seca nos tubos de incubação com a adição de TGL e o controlo (sem TGL) durante 6 horas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal.**



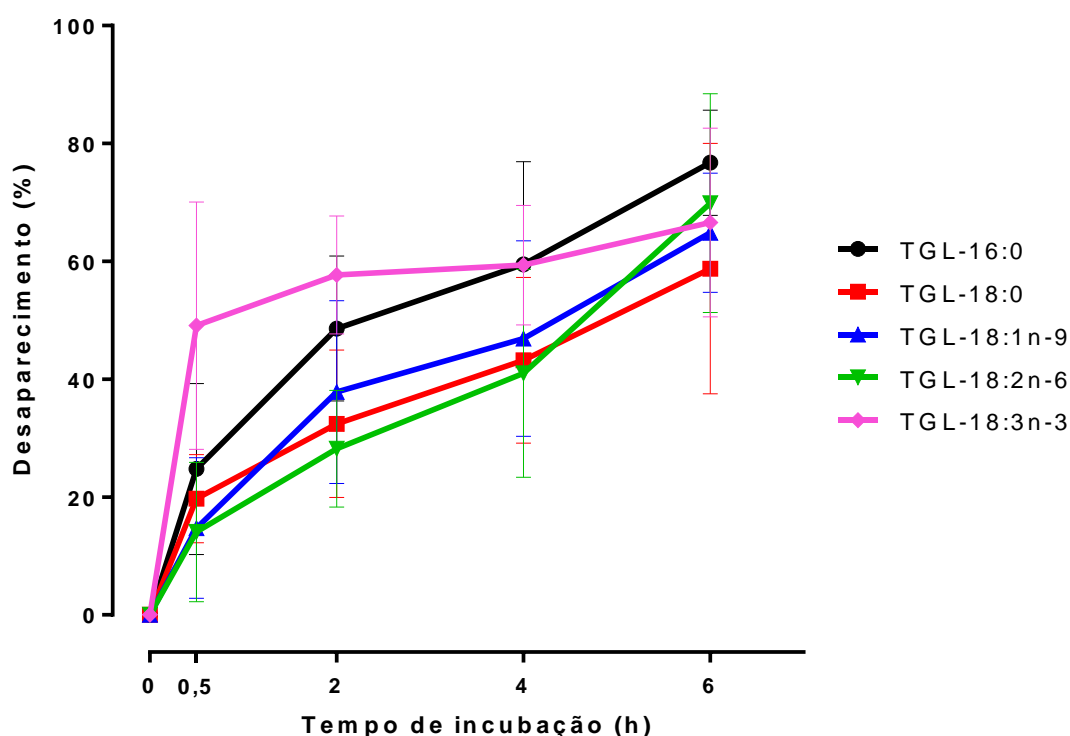
### 5.2. Hidrólise dos triacilgliceróis

A lipólise (hidrólise) dos triacilgliceróis foi avaliada após separação das classes de lípidos do conteúdo incubado e posterior análise dos AG da fração dos triacilgliceróis. O desaparecimento foi calculado por diferença entre cada um dos AG ao tempo de incubação 0 e ao fim de cada uma das 0,5, 2, 4 e 6 horas de incubação.

O gráfico 2 mostra os resultados de desaparecimento de cada um dos TGL testados durante 6 horas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal. Verificou-se que às 0,5, 2 e 4 horas de incubação as taxas de desaparecimento, numericamente mais baixas, foram

observadas para o TGL-18:2n-6, sendo respectivamente 14,1%, 28,2% e 41%. O TGL-18:3n-3 apresentou as taxas de desaparecimento numericamente mais elevadas às 0,5 (49,1%) e 2 (57,7%) horas e o TGL-16 as taxas mais elevadas às 4 (59,5%) e 6 (76,7%) horas de incubação. Pelo gráfico 2 também se observa que o desaparecimento do 18:3n-3 foi mais rápido na primeira meia hora de incubação, estabilizando aparentemente a partir das 2 horas ao contrário dos outros AG que sugerem desaparecimentos graduais ao longo do tempo de incubação.

**Gráfico 2 - Cinética do desaparecimento (%) de cada um dos AG na fração dos TGL durante 6 horas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal.**



Na Tabela 7 é apresentada a análise estatística dos resultados do Gráfico 2, em que se avaliou i) o efeito do tempo de incubação (0,5, 2, 4 e 6 horas) para cada um dos TGL estudados (comparação na mesma linha) e, ii) o efeito dos diferentes TGL a cada um dos tempos de incubação (comparação na mesma coluna). Relativamente ao efeito do tempo de incubação no desaparecimento de cada AG individualmente, verificou-se que o desaparecimento aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) ao longo do tempo de incubação com os TGL-16:0, TGL-18:1n-9 e TGL-18:2n-6, e uma tendência ( $P = 0,057$ ) de aumento com o TGL-18:0. Apenas não se verificaram diferenças significativas ( $P = 0,726$ ) no desaparecimento do TGL-18:3n-3 ao longo do tempo. Relativamente ao efeito dos TGL não se observaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em nenhum dos

tempos estudados, observando-se desaparecimentos médios de 67,4% às 6 horas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal.

**Tabela 7. Desaparecimento (%) dos AG de cada um dos triacilgliceróis estudados durante 6 horas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal.**

TGL	Tempo de incubação (h)				EPM	P value Tempo
	0,5	2	4	6		
TGL-16:0	24,8 <sup>b</sup>	48,6 <sup>ab</sup>	59,5 <sup>ab</sup>	76,7 <sup>a</sup>	7,88	0,010
TGL-18:0	19,7	32,4	43,2	58,8	8,47	0,057
TGL-18:1c9	14,7 <sup>b</sup>	37,8 <sup>ab</sup>	46,9 <sup>ab</sup>	64,8 <sup>a</sup>	7,95	0,013
TGL-18:2n-6	14,1 <sup>b</sup>	28,2 <sup>ab</sup>	41,0 <sup>ab</sup>	69,9 <sup>a</sup>	8,63	0,010
TGL-18:3n-3	49,1	57,7	59,4	66,6	10,6	0,726
P value (TGL)	0,099	0,132	0,476	0,715		

Médias na mesma linha que apresentem letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05).

### 5.3. Ácidos gordos na fração dos ácidos gordos livres

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados do teor em AGT (mg/g MS) e da composição em AG na fração de AG-livres, ao longo do tempo de incubação, com a adição do TGL-16:0. Verificou-se então um aumento significativo (P=0,047) na quantidade em AGT com o aumento do tempo de incubação, apresentando um teor de 6,08 mg/g MS às 0 horas, enquanto que às 6 horas a quantidade de AGT foi de 10,2 mg/g MS. Relativamente à composição em AG, identificaram-se 18 AG diferentes, sendo o 18:0 e o 16:0 os AG em maior proporção ao longo de todo o tempo de incubação. No entanto, apenas se verificou uma tendência de aumento das proporções do 16:0 e do 18:1 $\omega$ 11 (P<1) com o tempo, sendo que a proporção do 16:0 foi de 19,5% às 0 horas e de 26,4% do total AG às 6 horas de incubação. Relativamente aos somatórios de AG, também não se verificaram diferenças significativas na proporção de AG saturados, monoinsaturados ou polinsaturados, apenas um efeito tendencialmente (P=0,074) positivo para o somatório dos AG-*trans*.

**Tabela 8. - Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-16:0 como substrato.**

AG	Tempo de incubação (h)					EPM	P value Tempo
	0	0,5	2	4	6		
AGT	6,08 <sup>b</sup>	6,91 <sup>ab</sup>	6,60 <sup>ab</sup>	7,02 <sup>ab</sup>	10,2 <sup>a</sup>	1,02	0,047
16:0	19,5	19,4	21,6	24,2	26,4	1,93	0,075
18:0	66,3	64,5	66,9	60,9	59,3	4,61	0,252
18:1 <i>t</i> 6/ <i>t</i> 7/ <i>t</i> 8	0,44	0,55	0,37	0,71	0,55	0,16	0,592
18:1 <i>t</i> 9	0,23	0,31	0,22	0,39	0,32	0,06	0,407
18:1 <i>t</i> 10	0,60	0,53	0,48	0,84	0,61	0,11	0,311
18:1 <i>t</i> 11	2,62	2,86	1,90	5,95	6,07	0,93	0,050
18:1 <i>t</i> 12	0,49	0,53	0,36	0,55	0,49	0,08	0,444
18:1 <i>c</i> 9	5,54	3,80	3,50	5,01	3,18	1,39	0,675
18:1 <i>t</i> 15	0,40	0,43	0,31	0,42	0,43	0,09	0,813
18:1 <i>c</i> 11	0,23	0,15	0,20	0,24	0,22	0,06	0,749
18:1 <i>c</i> 12	0,24	0,24	0,05	0,28	0,32	0,07	0,220
18:1 <i>t</i> 16/ <i>c</i> 14	0,52	0,55	0,41	0,55	0,50	0,08	0,348
18:2n-6	6,09	2,68	3,57	3,00	2,61	1,46	0,453
20:0	1,11	1,09	1,16	1,02	0,93	0,07	0,286
18:3n-3	0,50	0,28	0,29	0,25	0,19	0,10	0,323
22:0	0,56	0,58	0,62	0,50	0,50	0,07	0,534
24:0	0,56	0,54	0,55	0,73	0,48	0,15	0,734
26:0	1,25	1,20	1,33	1,05	0,99	0,30	0,284
<b>Somatórios</b>							
AGS	84,0	87,1	90,3	83,7	88,6	5,40	0,750
AGMI	9,86	9,95	6,36	13,5	9,59	4,06	0,635
AG- <i>trans</i>	5,36	5,75	4,11	9,47	9,04	1,20	0,074
AGPI	6,58	2,96	3,84	3,24	2,78	1,52	0,425

Abreviaturas: AG, ácidos gordos; AGT, ácidos gordos totais; AGS, ácidos gordos saturados; AGMI, ácidos gordos monoinsaturados; AGPI, ácidos gordos polinsaturados. Médias na mesma linha que apresentem letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados do teor em AGT (mg/g MS) e da composição em AG na fração de AG-livres, durante as 6 horas de incubação *in vitro*, com a adição do TGL-18:0. A tabela mostra que não se verificou nenhum efeito significativo ( $P = 0,376$ ) do tempo de incubação no teor em AGT, apresentando um teor médio de 6 mg/g MS. Dos 18 AG identificados, os maioritários na fração dos AG-livres foram o 18:0 e o 16:0, compreendendo cerca de 61,2-71,3% e 18,8-16,6% do total de AG, respetivamente. No entanto, apenas o 16:0, 18:2n-6 e 20:0 variaram ( $P < 0,05$ ) ao longo do tempo de incubação. Para o 16:0, o valor mais elevado foi verificado às 4 horas (18,2% do total AG) e o valor mais baixo foi verificado às 6 horas (15,8% do total AG), apresentando valores intermédios às restantes horas. Para o 18:2n-6, o valor mais elevado foi verificado às 0,5 horas (9,71% do total AG) e o valor mais baixo foi verificado às 6 horas (1,72% do total AG), apresentando valores intermédios às restantes horas. Para o 20:0, o valor mais elevado foi verificado às 4 horas (1,31% do total AG) e o valor

mais baixo foi verificado às 2 horas (0,93% do total AG), apresentando valores intermédios às restantes horas. Relativamente aos somatórios, não foram verificadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) ao longo do tempo, apenas uma tendência ( $P=0,057$ ) para os AGPI diminuírem com o aumento do tempo de incubação.

**Tabela 9. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-18:0 como substrato.**

AG	Tempo de incubação (h)					EPM	P value Tempo
	0	0,5	2	4	6		
AGT	6,52	4,61	5,58	5,48	7,60	1,05	0,376
16:0	17,3 <sup>ab</sup>	17,0 <sup>ab</sup>	16,6 <sup>ab</sup>	18,2 <sup>a</sup>	15,8 <sup>b</sup>	1,98	0,014
18:0	64,7	61,2	68,0	71,3	69,0	5,70	0,380
18:1 <i>t</i> 6/ <i>t</i> 7/ <i>t</i> 8	0,60	0,93	0,69	0,91	0,64	0,15	0,581
18:1 <i>t</i> 9	0,31	0,43	0,33	0,44	0,47	0,12	0,820
18:1 <i>t</i> 10	0,68	1,03	0,76	0,78	0,65	0,21	0,387
18:1 <i>t</i> 11	3,18	4,57	4,78	4,80	6,12	1,65	0,468
18:1 <i>t</i> 12	0,44	0,53	0,58	0,44	0,40	0,15	0,228
18:1 <i>c</i> 9	4,48	7,13	4,56	1,60	3,30	2,10	0,217
18:1 <i>t</i> 15	0,46	0,34	0,50	0,27	0,48	0,09	0,533
18:1 <i>c</i> 11	0,26	0,35	0,27	0,27	0,22	0,08	0,805
18:1 <i>c</i> 12	0,39	0,82	0,38	0,27	0,36	0,12	0,183
18:1 <i>t</i> 16/ <i>c</i> 14	0,60	0,54	0,66	0,29	0,49	0,09	0,227
18:2n-6	7,56 <sup>ab</sup>	9,71 <sup>a</sup>	4,12 <sup>ab</sup>	1,81 <sup>ab</sup>	1,72 <sup>b</sup>	1,58	0,033
20:0	1,11 <sup>ab</sup>	0,98 <sup>ab</sup>	0,93 <sup>b</sup>	1,31 <sup>a</sup>	1,08 <sup>ab</sup>	0,07	0,034
18:3n-3	0,43	0,65	0,26	0,27	0,27	0,19	0,460
22:0	0,55	0,53	0,60	0,68	0,56	0,10	0,418
24:0	0,61	0,44	0,72	0,51	0,50	0,14	0,516
26:0	1,27	1,54	1,40	1,41	1,30	0,32	0,754
<b>Somatórios</b>							
AGS	85,6	81,5	86,6	93,43	88,3	7,47	0,376
AGMI	9,10	13,6	10,8	4,00	9,84	5,53	0,340
AG- <i>trans</i>	3,51	5,60	5,52	4,84	6,16	3,44	0,690
AGPI	7,98	10,4	4,37	2,07	1,90	1,80	0,057

Abreviaturas: AG, ácidos gordos; AGT, ácidos gordos totais; AGS, ácidos gordos saturados; AGMI, ácidos gordos monoinsaturados; AGPI, ácidos gordos polinsaturados. Médias na mesma linha que apresentem letras diferentes são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados do teor em AGT (mg/g MS) e da composição em AG na fração de AG-livres, durante as 6 horas de incubação *in vitro*, com a adição do TGL-18:1*c*9. Os resultados mostram que o teor em AGT aumentou ( $P=0,032$ ) com o aumento do tempo de incubação, apresentando 5,79 mg/g MS no início da incubação e após as 6 horas apresentou um teor de 12,6 mg/g MS. Foram identificados 17 AG, dos quais 10 variaram ( $P<0,05$ ) com o tempo de incubação, dos mais relevantes destacam-se o aumento do 18:1*c*9, que passou de 2,08% para 28,7% do total AG ao fim das 6 horas de incubação. Também grande parte dos AG de configuração *trans*, nomeadamente o 18:1-*t*6/*t*7/*t*8, -*t*9, -*t*11, -*t*12 e -*t*15, aumentaram

significativamente ( $P<0,05$ ), ou tendencialmente ( $P=0,097$ ) no caso do 18:1*t*10, com o aumento do tempo de incubação. Ao contrário, os AG saturados, 16:0, 18:0, 20:0 e 22:0 diminuíram ( $P<0,05$ ) ao longo do tempo, sendo essa diminuição mais relevante para o 16:0 que iniciou com uma proporção de 20,1% e às 6 horas apresentou 9,28% do total AG. Estes resultados refletem as diferenças que foram observadas nos somatórios dos AG saturados, monoinsaturados e *trans*.

**Tabela 10. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-18:1*c*9 como substrato.**

AG	Tempo de incubação (h)					EPM	P value Tempo
	0	0,5	2	4	6		
AGT	5,79 <sup>b</sup>	8,37 <sup>ab</sup>	8,16 <sup>ab</sup>	10,5 <sup>ab</sup>	12,6 <sup>a</sup>	1,30	0,032
16:0	20,1 <sup>a</sup>	13,4 <sup>b</sup>	12,2 <sup>b</sup>	10,0 <sup>b</sup>	9,28 <sup>b</sup>	1,90	0,001
18:0	71,6 <sup>a</sup>	63,0 <sup>ab</sup>	50,7 <sup>ab</sup>	48,5 <sup>b</sup>	51,3 <sup>ab</sup>	6,97	0,024
18:1 <i>t</i> 6/ <i>t</i> 7/ <i>t</i> 8	0,14 <sup>c</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,67 <sup>ab</sup>	0,81 <sup>ab</sup>	0,98 <sup>a</sup>	0,13	0,001
18:1 <i>t</i> 9	0,21 <sup>c</sup>	0,38 <sup>bc</sup>	0,48 <sup>b</sup>	0,48 <sup>b</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,11	<0,001
18:1 <i>t</i> 10	0,22	0,57	0,59	0,54	0,69	0,14	0,097
18:1 <i>t</i> 11	0,59 <sup>b</sup>	2,56 <sup>a</sup>	3,05 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>	0,87	0,009
18:1 <i>t</i> 12	0,11 <sup>b</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,10	0,005
18:1 <i>c</i> 9	2,08 <sup>b</sup>	12,1 <sup>ab</sup>	25,8 <sup>a</sup>	30,8 <sup>a</sup>	28,7 <sup>a</sup>	6,95	0,009
18:1 <i>t</i> 15	0,07 <sup>b</sup>	0,21 <sup>ab</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,35 <sup>ab</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,08	0,016
18:1 <i>c</i> 11	0,11	0,18	0,18	0,24	0,17	0,08	0,778
18:1 <i>t</i> 16/ <i>c</i> 14	0,16	0,33	0,44	0,40	0,45	0,09	0,167
18:2 <i>n</i> -6	0,73	3,26	2,52	1,87	1,19	0,87	0,106
20:0	1,23 <sup>a</sup>	0,90 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>b</sup>	0,73 <sup>b</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,10	0,011
18:3 <i>n</i> -3	0,10	0,39	0,20	0,24	0,13	0,09	0,088
22:0	0,63 <sup>a</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,46 <sup>ab</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,04	0,004
24:0	0,54	0,44	0,30	0,41	0,30	0,07	0,055
26:0	1,44	0,90	0,77	0,82	0,71	0,33	0,166
Somatórios							
AGS	95,5 <sup>a</sup>	79,2 <sup>ab</sup>	65,1 <sup>b</sup>	60,8 <sup>b</sup>	62,6 <sup>b</sup>	8,79	0,006
AGMI	3,66 <sup>b</sup>	17,2 <sup>ab</sup>	32,2 <sup>a</sup>	37,1 <sup>a</sup>	36,0 <sup>a</sup>	8,04	0,005
AG- <i>trans</i>	1,46 <sup>b</sup>	4,95 <sup>a</sup>	6,23 <sup>a</sup>	6,02 <sup>a</sup>	7,15 <sup>a</sup>	1,27	0,002
AGPI	0,83	3,65	2,72	2,11	1,32	0,94	0,096

Abreviaturas: AG, ácidos gordos; AGT, ácidos gordos totais; AGS, ácidos gordos saturados; AGMI, ácidos gordos monoinsaturados; AGPI, ácidos gordos polinsaturados. Médias na mesma linha que apresentem letras diferentes são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados do teor em AGT (mg/g MS) e da composição em AG na fração de AG-livres, durante as 6 horas de incubação *in vitro* com a adição do TGL-18:2*n*-6. Os resultados mostram que o teor em AGT aumentou ( $P=0,01$ ) com o aumento do tempo de incubação, sendo esse aumento mais significativo entre as 2 e as 6 horas, de 8,16 mg/g MS para 17,5 mg/g MS, respetivamente. Na fração dos AG-livres foram identificados 19 AG, sendo que o mais abundante a seguir ao 18:0 foi o 18:2*n*-6, no entanto nenhum dos dois variou ( $P>0,05$ ) ao longo do tempo,



apresentando valores médios de 50,5% e 18,9% para o 18:0 e 18:2n-6, respetivamente. No entanto todos os AG monoinsaturados de configuração *trans*, variaram significativamente ( $P<0,05$ ) ou tendencialmente ( $P<1$ ) ao longo do tempo de incubação, sendo no início da incubação (tempo 0) que as proporções foram mais baixas, e às 4 ou 6 horas que as proporções foram mais elevadas. Dos AG *trans*, o 18:1*t*11 foi o que revelou um aumento mais relevante, de aproximadamente 6,5x mais, entre as 0 e as 6 horas de incubação. Assim, verificaram-se também diferenças significativas ( $P<0,05$ ) para os somatórios dos AG monoinsaturados e AG-*trans*, os quais apresentaram às 0 horas proporções de 8,45% e 3,96%, respetivamente, e às 6 horas apresentaram proporções de 21,6% e 17,5% do total de AG, respetivamente.

**Tabela 11. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG livres com a utilização de TGL-18:2n-6 como substrato.**

AG	Tempo de incubação (h)					EPM	P value Tempo
	0	0,5	2	4	6		
AGT	7,57 <sup>b</sup>	7,18 <sup>b</sup>	8,16 <sup>b</sup>	12,7 <sup>ab</sup>	17,5 <sup>a</sup>	2,15	0,014
16:0	15,2 <sup>a</sup>	12,6 <sup>ab</sup>	13,0 <sup>ab</sup>	8,78 <sup>b</sup>	8,89 <sup>b</sup>	1,98	0,004
18:0	54,47	51,3	53,3	45,0	48,2	5,35	0,220
18:1 <i>t</i> 6/ <i>t</i> 7/ <i>t</i> 8	0,34 <sup>b</sup>	0,53 <sup>ab</sup>	0,64 <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,07	0,020
18:1 <i>t</i> 9	0,23 <sup>b</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,42 <sup>a</sup>	0,37 <sup>ab</sup>	0,05	0,014
18:1 <i>t</i> 10	0,49	0,86	0,79	1,07	0,95	0,18	0,079
18:1 <i>t</i> 11	1,85 <sup>b</sup>	4,80 <sup>ab</sup>	4,98 <sup>ab</sup>	13,7 <sup>a</sup>	13,8 <sup>a</sup>	2,84	0,011
18:1 <i>t</i> 12	0,35 <sup>b</sup>	0,53 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>ab</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,06	0,012
18:1 <i>c</i> 9	4,24	4,02	3,87	3,56	3,27	0,56	0,343
18:1 <i>t</i> 15	0,31 <sup>c</sup>	0,41 <sup>abc</sup>	0,37 <sup>bc</sup>	0,51 <sup>ab</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,03	0,004
18:1 <i>c</i> 11	0,10	0,16	0,19	0,19	0,21	0,03	0,131
18:1 <i>c</i> 12	0,16 <sup>b</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,12	0,007
18:1 <i>t</i> 16/ <i>c</i> 14	0,40 <sup>b</sup>	0,51 <sup>ab</sup>	0,46 <sup>ab</sup>	0,66 <sup>a</sup>	0,63 <sup>ab</sup>	0,08	0,029
18:2n-6	18,4	19,9	17,4	20,2	18,6	5,43	0,988
20:0	0,98 <sup>a</sup>	0,88 <sup>ab</sup>	0,87 <sup>ab</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,09	0,011
18:3n-3	0,38	0,18	0,24	0,36	0,14	0,13	0,267
18:2 <i>c</i> 9 <i>t</i> 11	0,23	0,64	0,51	1,51	0,57	0,43	0,296
22:0	0,48 <sup>a</sup>	0,42 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,05	0,007
24:0	0,47 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,35 <sup>ab</sup>	0,05	0,008
26:0	1,09 <sup>a</sup>	0,93 <sup>ab</sup>	0,93 <sup>ab</sup>	0,65 <sup>b</sup>	0,69 <sup>ab</sup>	0,25	0,034
<i>Somatórios</i>							
AGS	72,6	66,5	69,1	55,6	59,0	7,53	0,061
AGMI	8,45 <sup>b</sup>	12,8 <sup>ab</sup>	12,8 <sup>ab</sup>	22,3 <sup>a</sup>	21,6 <sup>a</sup>	3,29	0,008
AG- <i>trans</i>	3,96 <sup>b</sup>	7,97 <sup>ab</sup>	8,12 <sup>ab</sup>	17,7 <sup>a</sup>	17,5 <sup>a</sup>	2,98	0,008
AGPI	18,7	20,1	17,6	20,6	18,8	5,48	0,987

Abreviaturas: AG, ácidos gordos; AGT, ácidos gordos totais; AGS, ácidos gordos saturados; AGMI, ácidos gordos monoinsaturados; AGPI, ácidos gordos polinsaturados. Médias na mesma linha que apresentem letras diferentes são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

**Tabela 12. Efeito do tempo de incubação (h) no teor em ácidos gordos totais (AGT) (mg/g MS) e composição em AG (% do total de AG) da fração de AG-livres com a utilização de TGL-18:3n-3 como substrato.**

AG	Tempo de incubação (h)					EPM	P value Tempo
	0	0,5	2	4	6		
AGT	5,33	5,93	6,46	8,71	10,1	1,35	0,133
16:0	16,1	12,5	14,3	13,2	13,3	2,80	0,181
18:0	58,5	50,0	58,7	59,3	58,8	8,57	0,678
18:1 <i>t</i> 6/ <i>t</i> 7/ <i>t</i> 8	0,53	0,56	0,45	0,61	0,60	0,11	0,762
18:1 <i>t</i> 9	0,37	0,72	0,35	0,45	0,41	0,21	0,578
18:1 <i>t</i> 10	0,64	0,60	0,50	0,65	0,60	0,14	0,837
18:1 <i>t</i> 11	2,39 <sup>c</sup>	3,79 <sup>abc</sup>	2,89 <sup>bc</sup>	5,59 <sup>ab</sup>	6,56 <sup>a</sup>	1,06	0,013
18:1 <i>t</i> 12	0,40 <sup>b</sup>	0,64 <sup>ab</sup>	0,44 <sup>ab</sup>	0,86 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>a</sup>	0,11	0,039
18:1 <i>c</i> 9	5,58	6,14	3,70	5,18	5,47	0,87	0,199
18:1 <i>t</i> 15	0,35 <sup>c</sup>	0,57 <sup>abc</sup>	0,46 <sup>bc</sup>	1,36 <sup>ab</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,18	0,012
18:1 <i>c</i> 11	0,21	0,30	0,13	0,18	0,23	0,04	0,050
18:1 <i>c</i> 12	0,16	0,50	0,39	0,63	0,64	0,15	0,184
18:1 <i>t</i> 16/ <i>c</i> 14	0,52 <sup>b</sup>	0,56 <sup>b</sup>	0,38 <sup>b</sup>	1,16 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>	0,18	0,024
18:1 <i>c</i> 15	0,14 <sup>b</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	0,22 <sup>ab</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>a</sup>	0,16	0,014
18:2 <i>t</i> 11 <i>c</i> 15	0,05 <sup>c</sup>	1,20 <sup>bc</sup>	0,89 <sup>c</sup>	2,97 <sup>ab</sup>	3,55 <sup>a</sup>	0,36	0,002
18:2n-6	4,01	4,98	2,51	1,87	1,79	1,64	0,513
18:2 <i>c</i> 12 <i>c</i> 15	-	0,17 <sup>ab</sup>	0,42 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,09	0,007
20:0	1,09	0,87	0,99	0,93	0,87	0,16	0,680
18:3n-3	6,72	12,41	9,80	8,42	6,97	6,05	0,879
18:2 <i>c</i> 9 <i>t</i> 11	0,11	0,39	0,17	0,18	0,11	0,09	0,194
18:3 <i>c</i> 9 <i>t</i> 11 <i>c</i> 15	0,17	0,75	0,58	1,10	0,97	0,28	0,279
22:0	0,51	0,49	0,43	0,46	0,45	0,10	0,946
24:0	0,49	0,49	0,46	0,45	0,46	0,07	0,980
26:0	1,13	1,18	1,18	0,71	1,04	0,42	0,666
<b>Somatórios</b>							
AGS	77,8	65,6	76,1	69,7	74,9	11,0	0,655
AGMI	11,2 <sup>ab</sup>	14,6 <sup>ab</sup>	9,91 <sup>b</sup>	17,5 <sup>ab</sup>	18,9 <sup>a</sup>	2,21	0,023
AG- <i>trans</i>	5,20 <sup>b</sup>	7,44 <sup>ab</sup>	5,47 <sup>b</sup>	10,7 <sup>a</sup>	11,8 <sup>a</sup>	1,37	0,012
AGPI	10,7	17,6	12,6	10,8	9,19	7,62	0,860
IB	5,71	10,6	7,75	16,0	12,9	3,62	0,223

Abreviaturas: AG, ácidos gordos; AGT, ácidos gordos totais; AGS, ácidos gordos saturados; AGMI, ácidos gordos monoinsaturados; AGPI, ácidos gordos polinsaturados; IB, intermediários da biohidrogenação. Médias na mesma linha que apresentem letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05).

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados do teor em AGT (mg/g MS) e da composição em AG na fração de AG-livres, durante as 6 horas de incubação *in vitro* com a adição do TGL-18:3n-3. Os resultados mostraram que o teor em AGT não variou (P=0,133) ao longo das 6 horas de incubação *in vitro*, no entanto, às 0 horas foi quantificado apenas 5,33 mg/g MS e ao fim das 6 horas foi quantificado 10,1 mg/g MS de AGT. O 18:3n-3 foi o terceiro AG mais abundante a todas as horas, mas não se observaram diferenças significativas (P=0,879) na sua proporção entre as 0 e as 6 horas de incubação, apresentando um valor médio de 8,9% do total AG. De facto, apenas se verificaram diferenças significativas (P<0,05) na proporção de AG 18:1, nomeadamente no *t*11, *t*12, *t*15, *t*16/*c*14, *c*15, e nos AG de cadeia 18:2, *t*11 *c*15 e *c*12 *c*15. Todos estes

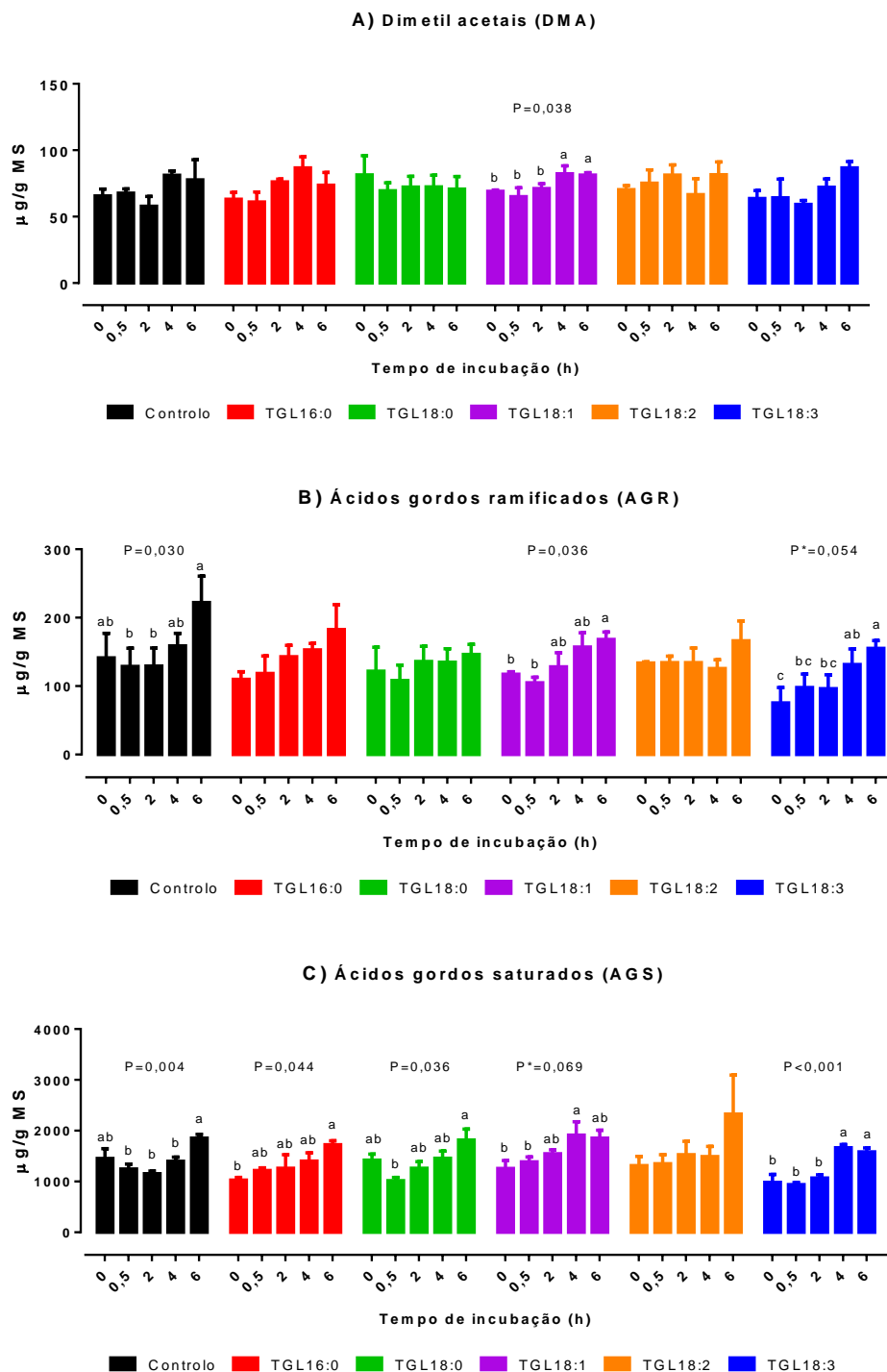
AG são intermediários da bioidrogenação ruminal do 18:3n-3, e apresentaram as proporções mais baixas no início da incubação (tempo 0) e as proporções mais elevadas às 6 horas de incubação. O aumento mais impressionante foi o do 18:2t11c15 que aumentou cerca de 70x entre as 0 e as 6 horas de incubação *in vitro* com inóculo ruminal.

#### 5.4. Ácidos gordos e dimetil acetais na fração dos fosfolípidos

O teor ( $\mu\text{g/g MS}$ ) em dimetil acetais (DMA), AG ramificados (AGR) e AG saturados (AGS), de acordo com o tempo de incubação e substrato adicionado, encontram-se apresentados nos Gráficos 3A, 3B e 3C, respetivamente. Relativamente aos DMA, apenas no grupo TGL-18:1, se verificou um aumento ( $P<0,05$ ) no teor em DMA na fração dos fosfolípidos a tempos de incubação mais elevados (4 e 6 horas), atingindo cerca de 81,8  $\mu\text{g/g MS}$ . No teor em AGR, verificaram-se diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre tempos de incubação nas amostras do Controlo, TGL-18:1 e TGL-18:3, sendo o valor mais alto verificado às 6 horas de 222, 168 e 155  $\mu\text{g/g MS}$ , respetivamente. No que diz respeito aos AGS, com a exceção do TGL-18:2, onde não se encontraram diferenças ( $P>0,05$ ) com o tempo de incubação, para todos os outros substratos, verificaram-se variações significativas ( $P<0,05$ ) ou tendências ( $P<1$ ). O teor mais elevado foi observado às 4 horas com o TGL-18:1 (1,9 mg/g MS) e TGL-18:3 (1,7 mg/g MS) e às 6 horas com o Controlo, TGL-16:0, e TGL-18:0, de cerca de 1,7, 1,8 e 1,9 mg/g MS, respetivamente. O teor ( $\mu\text{g/g MS}$ ) em AG monoinsaturados (AGMI), AG polinsaturados (AGPI) e AG 18:1-*trans*, de acordo com o tempo de incubação e substrato adicionado, encontram-se apresentados nos Gráficos 4A, 4B e 4C, respetivamente. Nos AGMI apenas foram encontradas diferenças significativas ( $P=0,035$ ) entre tempos de incubação, no grupo controlo e uma tendência ( $P=0,071$ ) nas incubações com o TGL-18:1. No grupo controlo o valor mais baixo foi verificado às 4 horas (238  $\mu\text{g/g MS}$ ) e o valor mais elevado foi verificado às 6 horas (393  $\mu\text{g/g MS}$ ). No que diz respeito aos AGPI, com exceção do grupo controlo que apresentou uma tendência ( $P=0,055$ ) de variação ao longo do tempo, em mais nenhum grupo se verificou efeitos significativos ( $P>0,05$ ) do tempo de incubação. No grupo controlo o valor mais baixo foi verificado às 4 horas (101  $\mu\text{g/g MS}$ ) e o valor mais elevado foi verificado às 6 horas (197  $\mu\text{g/g MS}$ ).

Também só no grupo controlo houve variação significativa ( $P=0,002$ ) do teor em 18:1-*trans* com o tempo de incubação, sendo que só a partir das 4 horas é que se verificou um aumento até atingir o valor de aproximadamente 90  $\mu\text{g/g MS}$ . No entanto, verificaram-se tendências ( $P<1$ ) de aumento do teor em AG 18:1-*trans* com o aumento do tempo de incubação com os TGL-18:1, TGL-18:2 e TGL-18:3.

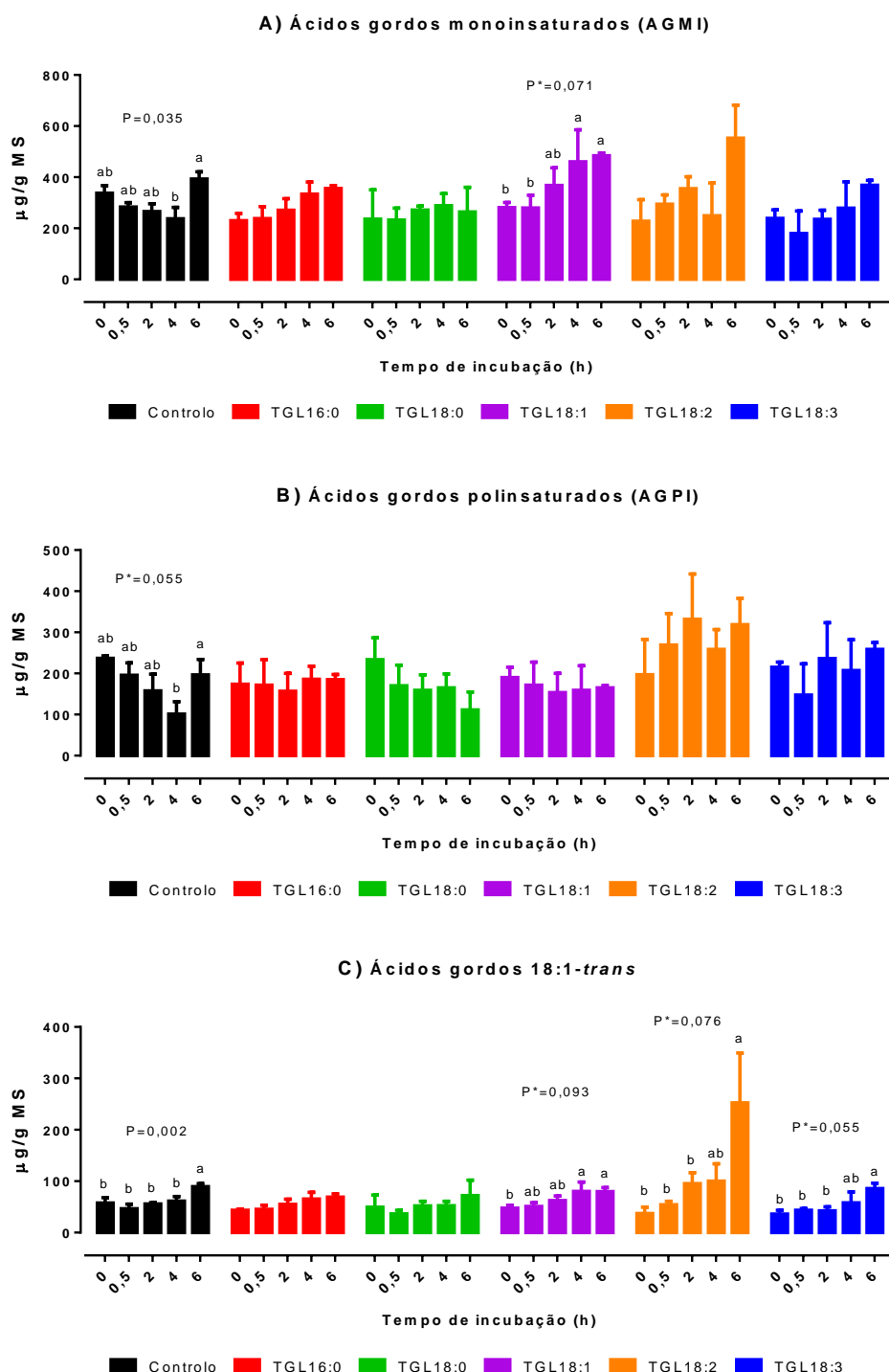
**Gráfico 3 - Concentração ( $\mu\text{g/g MS}$ ) de: A) Dimetil acetais (DMA); B) Ácidos gordos ramificados (AGR); C) Ácidos gordos saturados (AGS), na fração dos fosfolípidos do conteúdo ruminal incubado às 0, 2,5, 2, 4 e 6 horas, com cada TGL ou sem adição de TGL (controle).**



DMA inclui: DMA-i-14:0, DMA-14:0, DMA-a-15:0, DMA-16:0 e DMA-18:1; AGR inclui: i-13:0, i-14:0, i-15:0, a-15:0, i-16:0, i-17:0 e a-17:0; AGS inclui: 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0 e 22:0.

Diferenças entre tempos de retenção para cada grupo foram consideradas significativas a  $P < 0,05$  e tendências a  $P < 0,1$ . Para o mesmo TGL, diferentes letras indicam diferenças entre tempos de incubação.

**Gráfico 4 - Concentração ( $\mu\text{g/g MS}$ ) de: A) Ácidos gordos monoinsaturados (AGMI); B) Ácidos gordos polinsaturados (AGPI); C) Ácidos gordos 18:1-*trans*, na fração dos fosfolípidos do conteúdo ruminal incubado às 0, 2,5, 2, 4 e 6 horas, com cada TGL ou sem adição de TGL (controlo).**



AGMI inclui: 16:1c9, 18:1t11 e 18:1c9; AGPI inclui: 18:2n-6 e 18:3n-3. Diferenças entre tempos de retenção em cada grupo foram consideradas significativas a  $P<0,05$  e tendências a  $P<0,1$ . Para o mesmo TGL, diferentes letras indicam diferenças entre tempos de incubação.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Lipólise

A lipólise ruminal é o processo de hidrólise dos lípidos esterificados da dieta que ocorre no rúmen e que vai permitir que os AG fiquem disponíveis para a biohidrogenação. No entanto a informação relativa às especificidades das enzimas lipolíticas no rúmen e aos lípidos que poderão ser mais resistentes à lipólise, é escassa, apesar de alguns estudos indicarem que a lipólise pode variar consideravelmente com a quantidade e fonte de lípidos adicionados à dieta (Garton et al. 1961; Beam et al. 2000). Assim, neste trabalho estudou-se a lipólise e a metabolização de 5 triacilgliceróis no rúmen através de incubações *in vitro* a 39 °C em CO<sub>2</sub> com inóculo ruminal coletado de uma ovelha fistulada. Para esse efeito utilizaram-se triacilgliceróis estruturados, contendo o mesmo AG ligado nas 3 posições no glicerol, variando, no entanto, no tamanho da cadeia e numero de duplas ligações na cadeia carbonada, abreviados como TGL-16:0, TGL-18:0, TGL-18:1, TGL-18:2 e TGL-18:3. Os tempos de incubação escolhidos neste trabalho (0,5, 2, 4 e 6 horas) tiveram em conta a informação que se conhece desde a década de 50 do século passado de que a hidrólise de triacilgliceróis no rúmen é um processo bastante rápido (Garton et al. 1958; Moate et al. 2008). De acordo com o descrito na literatura também os nossos resultados mostraram que ao fim de 6 horas de incubação, mais de 58% dos AG nos diferentes TGL estudados foram hidrolisados. Esta lipólise foi avaliada pelo desaparecimento dos AG dos respetivos TGL na fração lipídica dos triacilgliceróis, e o posterior aparecimento na fração dos AG-livres, ou dos seus derivados, como irá ser discutido no ponto seguinte (6.2.).

A maioria dos estudos sobre a lipólise de triacilgliceróis no rúmen, utiliza gorduras vegetais como fonte dos triacilgliceróis, por exemplo óleo de linho, azeite ou manteiga de cacao (Garton et al. 1961), óleo de soja (Beam et al. 2000), ou óleo de girassol (Gulati et al. 1997). Sendo estas, fontes naturais, a composição em triacilgliceróis é complexa pelo que se torna difícil fazer comparações entre a lipólise de triacilgliceróis específicos. No entanto, Garton et al. (1961) encontrou graus de lipólise de aproximadamente 95% para o óleo de linho e de 40% para a manteiga de cacau, sugerindo que a reduzida lipólise observada na manteiga de cacau poderá estar relacionada com o maior teor em AGS. No nosso trabalho verificámos que apesar de não haver diferenças significativas entre TGL a cada um dos tempos de incubação individualmente, o TGL-18:0 foi o que apresentou um menor grau de lipólise após 6 horas de incubação *in vitro* e o TGL-16:0 o que apresentou numericamente um maior grau de lipólise (avaliada pelo

desaparecimento do 18:0 e 16:0, respetivamente). Assim não foi possível tirar conclusões sobre o efeito do tamanho da cadeia carbonada na lipólise ruminal. Possivelmente dada a variabilidade entre semanas (réplicas) nos resultados *in vitro*, deveria ser necessário um maior número de réplicas para se conseguirem observar diferenças significativas. Mas por observação das curvas de desaparecimento de cada um dos AG dos respetivos TGL, verifica-se que no caso do TGL-18:3n-3 (Gráfico 2), o desaparecimento é muito rápido logo às 0,5 horas (49% de desaparecimento), estabilizando a partir das 2 horas. Estes resultados sugerem então que TGL contendo ácido linolénico, ou seja, AG mais insaturados poderão hidrolisar mais rapidamente. No estudo desenvolvido por Garton et al. (1961) usando óleo de linho como substrato, a extensão da hidrólise microbiana de triacilgliceróis observada quando estes foram incubados anaerobiamente a 37 °C com conteúdo ruminal de ovelhas foi variável, mas também bastante considerável (>90%).

Segundo Beam et al. (2000) a lipólise pode variar notavelmente, não só com a fonte de lípidos, mas também com a quantidade de lípidos adicionados à dieta, sendo que a taxa percentual inicial de lipólise diminui à medida que a quantidade de gordura adicionada ao meio de incubação aumenta. Neste trabalho, a quantidade de triacilgliceróis adicionada foi ajustada para ser a mesma, pelo que não se testou se a quantidade de TGL teria influência na hidrólise dos diferentes TGL estudados.

Assim, as únicas diferenças que se verificaram no estudo da lipólise com os diferentes TGL testados foi o desaparecimento dos AG na fração dos triacilgliceróis ao longo do tempo, de acordo com o que se esperaria pelo reportado por outros autores (Garton et al. 1961; Beam et al. 2000; Moate 2008). Apenas não se verificaram diferenças para o TGL-18:3 a partir das 0,5 horas, como já foi discutido anteriormente. Para os outros TGL testados teria sido importante estender o tempo de incubação por mais algumas horas, uma vez que as curvas de desaparecimento dos AG aparentam ainda continuar em crescimento, sugerindo que as enzimas ainda não atingiram a velocidade máxima de hidrólise dos TGL às 6 horas de incubação nestas condições experimentais.

## **6.2 Bioidrogenação**

Uma vez que a bioidrogenação é avaliada com a obtenção de formas mais saturadas dos AG comparativamente com os AG originais (Marín et al. 2010; Bessa 2019), foi possível avaliar a bioidrogenação por análise do aparecimento de determinados AG, na fração dos AG-livres, ao longo das 6 horas de incubação *in vitro*. Os nossos resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Hawke e Silcock (1969), que observaram

que os AG-Livres eram muito mais saturados do que os AG componentes dos triacilgliceróis. Assim, como seria de esperar não se encontraram grandes diferenças na composição em AG na fração dos AG-livres nas incubações com os TGL-16:0 e TGL-18:0 ao longo das 6 horas de incubação *in vitro* com fluido ruminal, uma vez que ambos libertam AGS que não são possíveis de biohidrogenar.

Em contraste a composição em AG da fração dos AG-livres das incubações com os TGL-18:1, TGL-18:2 e TGL-18:3, reflete o padrão de biohidrogenação conhecido dos AG 18:1c9, 18:2n-6 e 18:3n-3, respetivamente (Harfoot and Hazelwood 1997; Jenkins et al. 2008; Lourenço et al. 2010). De facto, as diferenças que foram verificadas na composição em AG na fração dos AG-livres, ao longo das 6 horas de incubação com o TGL-18:1, foram sobretudo o aumento na proporção de isómeros 18:1 *trans*. Estes resultados sugerem que depois da hidrólise do 18:1c9, este sofre isomerização *cis/trans* com a formação de diversos isómeros 18:1 *trans*. A formação de uma ampla gama de isómeros 18:1 *trans* por isomerização do ácido oleico levada a cabo pelos microrganismos do rúmen foi já comprovada por diversos autores utilizando isótopos estáveis (Proell et al. 2002; Mosley et al. 2002, 2006). Este padrão de isómeros pode, no entanto, ser influenciada *in vivo* pelo tipo de dieta ou ambiente ruminal (Bessa et al. 2015).

O padrão dos AG que foram afetados pelo tempo, nas incubações com o TGL-18:2, também refletem as vias de biohidrogenação conhecidas do ácido linoleico (Harfoot and Hazelwood 1997; Jenkins et al. 2008; Lourenço et al. 2010). Nomeadamente, sabe-se que o primeiro passo da biohidrogenação do 18:2n-6 é a isomerização da dupla ligação no carbono C12, formando um AG conjugado, 18:2c9t11. Assim, nas incubações com TGL-16:0 ou TGL-18:0, não se detetou a ocorrência do 18:2c9t11, mas detetou-se nas incubações com TGL-18:2, e em menor quantidade com o TGL-18:3. A ausência de efeito significativos na proporção do 18:2c9t11 ao longo do tempo de incubação, sugere que este é apenas transiente e que rapidamente é hidrogenado formando o 18:1t11. De facto, o segundo passo da biohidrogenação do 18:2n-6 engloba a hidrogenação da dupla ligação no C9, formando então como o principal intermediário o 18:1t11 (conforme foi esquematizado na Figura 6 da revisão bibliográfica). Neste estudo a proporção do 18:1t11 aumentou de 1,85% no início da incubação até uns expressivos 13,8% do total dos AG após as 6 horas de incubação. Houve acumulação do 18:1t11 ao invés de ser rapidamente hidrogenado a 18:0, isso pode estar associado com a especificidade das bactérias no rúmen, em que apenas algumas bactérias terão a capacidade de hidrogenar completamente os intermediários 18:1 *trans* a 18:0 (Jenkins et al. 2008; Lourenço et al. 2010).



A biohidrogenação do ácido linolénico, libertado após hidrólise do TGL-18:3, levou ao aparecimento de diversos AG que não foram detetados nas incubações com os outros TGL testados. Estes AG foram os 18:3c9t11c15, 18:2t11c15, e 18:2c12c15. Todos estes têm sido descritos de serem exclusivamente formados durante a biohidrogenação do 18:3n-3 (Harfoot and Hazelhood, 1997, Jenkins et al. 2008, Alves et al. 2012), os dois primeiros foram descritos já há décadas de derivarem do 18:3n-3 por isomerização da dupla ligação no C12 e posterior hidrogenação, respetivamente. Mais recentemente, o 18:2c12c15 foi encontrado nos conteúdos digestivos e tecidos de animais alimentados com fontes em 18:3n-3, e daí associado à biohidrogenação do 18:3n-3 no rúmen (Alves et al. 2007). A hidrogenação destes intermediários 18:2 está associada à formação quer do 18:1t11, quer do isómero 18:1c15 (Body 1976). De todos estes intermediários, só o 18:3c9t11c15 é que não aumentou com o aumento do tempo de incubação no nosso estudo, o que mais uma vez poderá sugerir que a primeira isomerização é muito rápida e o 18:3c9t11c15 que se forma é rapidamente hidrogenado formando o 18:2t11c15. Esperar-se-ia que tanto na fração dos AG-livres das incubações com o 18:2n-6 e o 18:3n-3, se observasse um aumento do 18:0 ao longo do tempo de incubação, já que este é o produto final da biohidrogenação de ambos os AGPI, no entanto tal não se verificou. Este facto pode ser devido ao tempo limitado de incubação (6 horas), levando apenas tempo para acumulação dos intermediários 18:1 e 18:2, ou ser devido a alguma inibição dos microrganismos responsáveis pela hidrogenação dos isómeros 18:1 a 18:0. No entanto, a inibição do último passo da biohidrogenação tem sido reportado por muitos autores, mas associada à presença de taninos (Khiaosa-Ard et al. 2009; Alves et al. 2017) ou óleos de origem marinha ricos em AGPI de cadeia muito longa (Bessa et al. 2015).

### **6.3 Produtos de origem microbiana**

Nos resultados do desaparecimento da matéria seca apresentados com cada um dos padrões lipídicos testados não se encontrou variação relativamente ao controlo, também em todos os grupos ocorreu diminuição na matéria seca ao longo das 6 horas de incubação, o que poderá sugerir que não ocorreu inibição na atividade e crescimento da população microbiana. Estes resultados estão de acordo com outros resultados *in vitro* utilizando o mesmo sistema de incubação (Alves et al. 2018).

Os lípidos estruturais das bactérias do rúmen contêm relevantes proporções de plasmalogénios (Miyagawa 1982) e outros fosfolípidos com elevada proporção de AG ramificados da série iso e anteiso (Vlaeminck et al. 2006). Assim, variações na concentração quer dos plasmalogénios, aqui analisados na forma de DMA, quer na

concentração em AG ramificados poderá ser indicador se ocorreram alterações ou inibição no crescimento microbiano. Como as alterações observadas na concentração destes produtos ao longo do tempo de incubação nos vários grupos foram poucas, ou quando existiram foram positivas, poderá indicar que não ocorreram grandes alterações na população microbiana no sistema *in vitro*, e que possivelmente a atividade das bactérias também não foi inibida. Estes resultados são consistentes com os resultados encontrados com as mesmas condições de incubação *in vitro*

com inóculo ruminal, mas com diferentes substratos testados (Costa et al. 2017; Costa et al. 2018; Alves et al. 2018).

Estudos feitos por Alves et al. (2013), identificaram vinte e quatro DMA em amostras do conteúdo ruminal e verificaram que o teor total em DMA não foi afetado pela dieta basal nem pela suplementação lipídica. No entanto, a falta de efeito no teor em DMA e as diferenças nas proporções individuais dos DMA entre dietas sugerem que os microrganismos do rúmen podem ajustar a composição em plasmalogénios como forma de responder a diferentes ambientes ruminais e desta forma manter a concentração total em níveis constantes.

A ocorrência de AG polinsaturados e AG *trans* na fração dos fosfolípidos poderá também indicar que as bactérias têm a capacidade de incorporar AG pré formados ou existentes no meio ruminal, o que pode refletir uma resposta na manutenção da fluidez das membranas celulares, como já foi sugerido por outros autores (Alves et al. 2013).

## 7. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Existem na literatura vários trabalhos desenvolvidos sobre lipólise de diferentes tipos de triacilgliceróis no rúmen, mais a maior parte deles utiliza gorduras vegetais como fonte dos triacilgliceróis naturais, por exemplo óleo de linho, azeite ou manteiga de cacão, óleo de soja e/ou óleo de girassol. Este é o primeiro trabalho que estuda a lipólise ruminal de triacilgliceróis estruturados. A variabilidade das repostas observadas, a curta duração das incubações e o reduzido número de réplicas não permitiram a obtenção de resultados totalmente conclusivos. Contudo, ficou claro que existem diferenças na lipólise de distintos triacilgliceróis estruturados, ilustrados pela muito rápida lipólise do TGL-18:3 e a reduzida extensão do TGL-18:0 às 6 horas.

A hidrólise dos ácidos gordos dos diferentes triacilgliceróis levou a que o 18:1c9, 18:2n-6 e 18:3n-3 ficassem disponíveis para o processo da bioidrogenação, o qual foi comprovada pelo padrão de ácidos gordos formados na fração dos ácidos gordos livres. Assim a atividade dos microrganismos ruminais não pareceu ter sido afetada pela presença dos triacilgliceróis estruturados, o que também foi comprovado pela concentração de produtos de origem microbiana, nomeadamente a presença de dimetil acetais e ácidos gordos ramificados na fração dos fosfolípidos.

Este estudo tem de ser continuado de modo a perceber se a utilização de triacilgliceróis estruturados poderá ser uma estratégia de contornar o metabolismo ruminal dos ácidos gordos. Nomeadamente, avaliar se os ácidos gordos nas posições externas dos triacilgliceróis são preferencialmente hidrolisados ou se a taxa de hidrólise difere entre as diferentes classes lipídicas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison MJ, Bryant MP, Keeney M, Katz I. 1962. Metabolic Function of Branched-Chain Volatile Fatty Acids, Growth Factors for Ruminococci .2. Biosynthesis of Higher Branched-Chain Fatty Acids and Aldehydes. *Journal of Bacteriology*, 83, 1084-1094.
- Alves SP, Bessa RJB. 2007. Identification of cis-12, cis-15 octadecadienoic acid and other minor polyenoic fatty acids in ruminant fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(5):879-883.
- Alves SPA. 2011. Ruminant lipid nutrition and metabolism: Development and application of methodologies for fatty acid analysis. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade de Porto.
- Alves SPA, Silva JS, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Bessa RJB. 2013. Detailed dimethylacetal and fatty acid composition of rumen content from lambs fed lucerne or concentrate supplemented with soybean oil. *PLOS ONE*, V.8: e58386.
- Alves SP, Francisco A, Costa M, Santos-Silva J, Bessa RJB. 2017. Biohydrogenation patterns in digestive contents and plasma of lambs fed increasing levels of a tanniferous bush (*Cistus ladanifer* L.) and vegetable oils. *Animal Feed Science and Technology* 225: 157–172.
- Alves SP, Mendonça SH, Silva JL, Bessa RJB. 2018. *Nannochloropsis oceanica*, a novel natural source of rumen-protected eicosapentaenoic acid (EPA) for ruminants. *Scientific Reports*.
- Bauchart D, Legaycarmier F, Doreau M, Gaillard B. 1990. Lipid-Metabolism of Liquid-Associated and Solid-Adherent Bacteria in Rumen Contents of Dairy-Cows Offered Lipid-Supplemented Diets. *British Journal of Nutrition* 63:563-578.
- Bauman DE, Baumgardb LH, Corl BA, Grinari JM. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American society of Animal Science*. [15p.].
- Bauman DE, Baumgardb LH, Corl BA, Grinari JM. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 77.
- Bauman DE, Perfield II JW, De Veth MJ, Lock AL. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Department of animal science. Cornell University*, 175 – 189.
- Beam TM, Jenkins TC, Moate PJ, Kohn RA, Palmquist DL. 2000. Effects of Amount and Source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, 83: 2564-2573.
- Bessa RJB, Santos-Silva J, Ribeiro JMR, Portugal AV. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*. 63:201– 211.
- Bessa RJB, Portugal PV, Mendes IA, Santos-Silva J. 2005. Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate. *Livestock Production Science*, 96:185-194.

Bessa RJB, Alves SP, Jerónima E, Alfaia CM, Prates JAM, Santos-Silva J. 2007. Effect of lipid supplements on ruminal biohydrogenation intermediates and muscle fatty acids in lambs. *European Journal Lipid Science and Technology*, 109:868-878.

Bessa RJB, Alves SP, Santos-Silva J. 2015. Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *European Journal Lipid Science and Technology*, 117: 1325-1344.

Bessa, Rui J. B. 2019. A metabolização dos ácidos gordos polinsaturados no rúmen. Lisboa (PT): Lipidanimal.  
[accessed 2019 Marc 5]  
<http://lipidanimal.fmv.utl.pt/index.php/pt/dossiers/150-bioidrogenação>.

Body DR. 1976. Occurrence of cis-octadec-15-enoic acid as a major biohydrogenation product from methyl linolenate in bovine rumen liquor. *Biochemical Journal* 157:741-744.

Botham, Kathleen M., Mayes, Peter A. 2012. Lípidios de Importância Fisiológica. Em Murray, Robert K., Bender, David A., Botham, Kathleen M., Kennelly, Peter J., Rodwell, Victor W., Weil, P. Anthony (dir.), *Harper Bioquímica Ilustrada*. 29 ed McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A, p. 140 -151, ISBN: 978-0-07-176576-3.

Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174:1-25.

Burin PC. 2016. Qualidade da gordura ovina: Característica e fatores de influência. REDVET - Revista eletrônica de Veterinária - V.17, Nº 10. ISSN 1695-7504.

Cabiddu A, Salis L, Tweed JKS, Molle G, Decandia M, Lee MRF. 2010. The influence of plant polyphenols on lipolysis and biohydrogenation in dried forages at different phenological stages: *in vitro* study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 829-835.

Cabrita PARN. 2011. Produção de Triacilgliceróis Estruturados Catalisada por Lípases Imobilizadas. Lisboa (Lis): Universidade Técnica de Lisboa - Instituto superior de Agronomia.

Carneiro MMY, Morais MG, De Goes RHTB, Filho ECC, Da Costa TG, Batista RS, Duarte LL, Souza ARDL. 2017. Lípidios na dieta de ruminantes. ANAIS DA X MOSTRA CIENTÍFICA FAMEZ / UFMS, CAMPO GRANDE. 240-247.

Christie, WW. 2018. Lipid Essentials: Structures, Occurrence, Basic biochemistry and function. The LipidWeb.  
[accessed 2019 Feb 3]  
<https://www.lipidhome.co.uk/index.html>

Christie WW. 2019. Fatty acids and oxylipins. The LipidWeb.  
[accessed 2019 May 30]  
<https://www.lipidhome.co.uk/index.html>

Costa RG, Cartaxo FQ, Santos NM, Queiroga RCE. 2008. Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais. *Revista Brasileira. Saúde Produção Animal*. v.9, n.3, 497-506, julho/setembro, ISSN 1519 9940.

Costa M, Alves SP, Cabo A, Guerreiro O, Stilwell G, Dentinho MT, Bessa RJB. 2017. Modulation of *in vitro* rumen biohydrogenation by *Cistus ladanifer* tannins compared with other tannin sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 629–635.

Costa M, Alves SP, Cappucci A, Cook SR, Durate A, Caldeira RM, Mc Allister TA, Bessa RJB. 2018. Effects of Condensed and Hydrolyzable Tannins on Rumen Metabolism with Emphasis on the Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 66, 3367-3377.

Courtney AR. 2017. Lipids. [place unknown]: Salem Press Encyclopedia of Science.

Dohme F, Fievez V, Raes K, Demeyer DI. 2003. Increasing levels of two different fish oils lower ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid *in vitro*. *Animal Research*. 52: 309 – 320.

Doreau M, Ferlay A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science Technology*. 45: 379-396.

Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RCJr, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, Van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 46:839–861.

Ferreira AMCM. 2016. Efeito da suplementação de dietas com lípidos de origem marinha na composição em ácidos gordos da carne de borrego. Lisboa: FMV – ISA, Universidade de Lisboa.

Fulco AJ. 1983. Fatty acid metabolismo in bactéria. Elsevier, volume 22, 133 – 160.

Gao B, Luo Y, Lu W, Liu J, Zhang Y, Yu L. 2017. Triacylglycerol compositions of sunflower, corn and soybean oils examined with supercritical CO<sub>2</sub> ultra-performance convergence chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 218:569-574.

Garton, G. A., P. N. Hobson, and A. K. Lough. 1958. Lipolysis in the rumen. *Nature* 182:1511–1512.

Garton GA, Lough AK, Vioque E. 1961. Glyceride hidrolisis and glycerol fermentation by sheep rumen contentes. *Journal of General Microbiology*. 25:215-225.

Gerson BVT, John A, King ASD. 1985. The effects of dietary starch and fibre on the *in vitro* rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. Department of Scientific and Industrial Research. Applied Biochemistry Division, Palmeraton North: New Zealand. *Journal of agriculture Science, Camb*. 105:7-30.

Glatz JFC. 2014. Lipids and lipid binding proteins: A perfect match. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 93:45–49.

Goldfine H. 2017. The anaerobic biosynthesis of plasmalogens. *Febs Letters* 591:2714-2719.

Guerreiro O, Alves SP, Costa Mónica, Cabo A, Duarte MF, Jerónimo E, Bessa RJB. 2016. Effects of extracts obtained from *Cistus ladanifer* L. on *in vitro* rumen biohydrogenation. *Animal Feed Science and Technology*, 304-312.

- Gulati SK, Scott TW, Ashes J.R. 1997. In-vitro assessment of fat supplements for ruminants, *Animal Feed Science and Technology*. 64: 127–132.
- Harfoot CG, Hazlewood GP. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem*. P. N Hobson, editor. Elsevier, London. 382–426.
- Hawke JC, Sitcock WR. 1969. Lipolysis and Hydrogenation in the Rumen Department of Chemistry and Biochemistry, Massey University, Palmerston North, New Zealand *Biochemical Journal*. 112:131 – 132.
- Jarvis GN, Moore ERB. 2010. Lipid Metabolism and the rumen microbial ecosystem. *Handbook of Hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, K. N. Timmis (ed), 2246-2257.
- Jenkins TC. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76:3851-3863.
- Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. 2008. BAORD - INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*. 86: 397-412.
- Khiaosa-Ard R, Bryner SF, Scheeder MRL, Wettstein HR, Leiber F, Kreuzer M, Soliva CR. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal  $\alpha$ -linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*. 92:177-188.
- Kozloski GV. 2011. *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria, RS. ed. Editora UFSM, [212p.].
- Lee MRF, Parfitt LJ, Scollan ND, Minchin FR. 2007. Lipolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities in the presence and absence of rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:1308–1314.
- Lee MRF. 2014. Forage polyphenol oxidase and ruminant livestock nutrition. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Lehninger AL. 1997. *Fundamentos de bioquímica*. The Johns Hopkins University School of medicine. Traduzido por: Lodi WR, Greene E. São Paulo – Brasil.
- List GR, Mounts TL, Orthoefer F, Neff WE. 1995. Margarine and shortening oils by interesterification of liquid and trisaturated triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists Society* 72:379-382.
- Lourenço M, Ramos-Morales E, Wallace RJ. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *The Animal Consortium*, 4: 1008-1023.
- Maia MRG, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, et al. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*. 10: 52.
- Marín ALM, Hernández MP, Alba LP, Castro GG, Pardo DC. 2010. Metabolismo de los lípidos. *REDVET - Revista electrónica de veterinária*. V.11, N°08. 21:1695-7504.

Mensink RP, Sanders TA, Baer DJ, Hayes K, Howles KPN, Marangoni A. 2016. The Increasing Use of Interesterified Lipids in the Food Supply and Their Effects on Health Parameters. *Advances in Nutrition* 7:719-729.

Miyagawa E. 1982. Cellular fatty-acid and fatty aldehyde composition of rumen bacteria. *Journal of General Applied Microbiology*. 28:389-408.

Moate PJ, Chalupa W, Jenkins RC. 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology*, 112: 79–105.

Moate PJ, Boston RC, Jenkins TC, Lean IJ. 2008. Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogenation of long-chain fatty acids: New insights from old data. *Journal of Dairy Science*; 91: 731-742.

Monroig Ó and Kabeya N. 2018. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fisheries Science*, 84: 911-928.

Mosley EE, Powell GL, Riley MB, Jenkins TC. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers *in vitro*. *Journal of Lipid Research*, 43: 290-296.

Mosley EE, Nudda A, Corato A, Rossi E, Jenkins T, McGuire MA. 2006. Differential biohydrogenation and isomerization of [U-C-13] oleic and [1-C-13] oleic acids by mixed ruminal microbes. *Lipids*; 41: 513-517.

Motta VT. 2009. *Bioquímica Clínica para laboratório: Princípios e Interpretações*. 5ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul.

Motta VT. 2011. *Bioquímica*. 2ª ed. Medbook, [488p.]. ISBN: 9788599977668.

Oliveira SG, Simas JMC, Santos FAP. 2004. Principais aspetos relacionados às alterações no perfil de ácidos gordos na gordura do leite de ruminantes. USP/ESALQ – Depto. De produção Animal, C.P.G- 13428-900 – Piracicaba (SP). *Archives of Veterinary Science*, V. 9, Nº 01, 73-80.

Oliveira AC, Silva RR, Oliveira HC, Almeida VVS, Garcia R, Oliveira ULC. 2013. Influence of diet, sex and genotype on the lipid profile of sheep meat. *Arquivos de zootecnia*, V. 62 (R), 57 – 72.

Proell JM, Mosley EE, Powell GL, Jenkins TC. 2002. Isomerization of stable isotopically labeled elaidic acid to cis and trans monoenes by ruminal microbes. *Journal of Lipid Research*, 43: 2072-2076.

Saluzzi L, Stewart CS, Flint HJ, Smith A. 1995. Plasmalogens of microbial communities associated with barley straw and clover in the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 17: 47-56.

Santana MCA, Rodrigues JFH, Cavali J, Bulcão LFA. 2017. Lípidos: Classificação e principais funções fisiológicas. *Revista electrónica de veterinaria*, V. 18, Nº 8.

Sant’Ana LS. 2004. Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo dos ácidos graxos ômega. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*. Universidade de Fortaleza. Fortaleza-Ceará, Brasil, V.17, Nº. 4, 211-216.



Scollan ND, Price EM, Morgan SA, Huws SA, Shingfield kJ. 2017. Can we improve the nutritional quality of meat? *Proceedings of the Nutrition Society* 76:603-618.

Solomon MB, Lynch GP, Ono K, Paroczay E. 1990. Lipid composition of muscle and adipose tissue from crossbred ram, wether and cryptorchid lambs. *Journal of Animal Science*, V.68, 137- 142.

Van Nevel CJ, Demeyer DI. 1995. Lipolysis and Biohydrogenation of soybean Oil in the rumen *in vitro*: Inhibition by Antimicrobials. Department of Animal Production, University of Ghent, 9090 Melle, Belgium. *Journal of Dairy Science*, 78: 2797-2806.

Van Nevel CJ, Demeyer DI. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by eumen contentes *in vitro*. Department of Animal Production, University of Gent, 9090 Melle, Belgium. *Reproduction Nutrition Development*, 36: 53-63.

Van Soest PJ. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Comstock Pub, 2<sup>a</sup> ed. Ithaca: Comstock Pub, [476 p.].

Vlaeminck B, Fievez V, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Dewhurst RJ. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131: 389–417.

Wegner GH, Foster EM. 1963. Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by bacteroides succinogenes. *Journal of Bacteriology*, 85: 53-61.

Zeitoun MAM, Neff WE, List GR, Mounts TL. 1993. Physical-properties of interesterified fat blends. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70:467-471.

## ANEXOS

### Anexo I: Procedimento para incubações *in vitro* com suco de rúmen utilizando o tampão de Goering and Van Soest

(Adaptado de Goering HK and Van Soest PJ. 1970. Forage fiber analysis: apparatus, reagentes, procedures and some applications)

Procedimentos a realizar na véspera do dia de incubação:

1. Pesagem das amostras:

1.1. Preparar tubos de incubação (Hungate): marcar e tirar a tara do tubo;

1.2. Pesar o alimento e os substratos a incubar para os tubos de incubação.

2. Solução tampão:

2.1. Preparar as soluções de acordo com as tabelas:

Solução micromineral (A)	
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	6,6 g
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	5 g
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeCl <sub>3</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	4 g
Dissolver em 50 mL H <sub>2</sub> O	

Solução macromineral (C)*	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro	570 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anidro	620 mg
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	60 mg
Dissolver em 100 mL H <sub>2</sub> O	

Resazurina 0.1% (w/v) (D)	
Dissolver 10 mg resazurina em 10 mL de H <sub>2</sub> O	

Solução tampão (B)*	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,4 g
NaHCO <sub>3</sub>	3,5 g
Dissolver em 100 mL H <sub>2</sub> O	

\* preparar no próprio dia

Solução redutora (E)*	
Cysteine·HCl	62,5 mg
1 N NaOH	0,4 mL
NaS·9 H <sub>2</sub> O	62,5 mg
Perfazer até 10 mL com H <sub>2</sub> O	

2.2. Adicionar 50 µL de solução micromineral (A) a 200 mL de água destilada e agitar;

2.3. Adicionar 100 mL de solução tampão (B), 100 mL de solução macromineral (C); de resazurina (D) e 3 mL de solução redutora (E) e agitar;

2.4. Saturar com CO<sub>2</sub>, visível com a passagem da cor azul para incolor (deixar durante a noite em corrente de CO<sub>2</sub>);

3. Preparação de material:

3.1. Colocar na estufa a 39 °C o seguinte material: um kitazato de 1 ou 2 L, um frasco de plástico com tampa para recolha de conteúdo ruminal, uma proveta de 100 mL, frascos de tampa azul de 500 mL, e pontas de plástico para pipeta de 5 mL;

3.2. Cortar a gaze em quadrados de cerca de 50 x 50 cm.

### **Procedimentos a realizar no dia da incubação:**

#### **4. Colheita e filtração:**

- 4.1. Recolher conteúdo ruminal de ovinos fistulados;
- 4.2. Filtrar o conteúdo ruminal de cada animal por 4 camadas de gaze com um funil de porcelana para um kitazato de 1 ou 2 L;
- 4.3. Juntar partes iguais do conteúdo filtrado de cada animal para um frasco de tampa azul e deixar saturar com CO<sub>2</sub> num banho a 39°C ou adicionar rapidamente à solução tampão se esta já estiver saturada com CO<sub>2</sub>.

#### **5. Incubação:**

- 5.1. Adicionar 100 mL de conteúdo ruminal filtrado à solução tampão do frasco de tampa azul na diluição 1:4 (fluido ruminal:tampão, v/v) para incubações de 24 horas e saturar com CO<sub>2</sub>;
- 5.2. Adicionar 6 mL do meio de incubação a 60 mg de substrato (pode variar consoante o estudo) em tubos de incubação de 16 mL;
- 5.3. Medir o pH do (ou dos conteúdos ruminais) e do meio de incubação.

## **Anexo 2. Extração de lípidos de conteúdo ruminal liofilizada resultante de incubações *in vitro***

(adaptado de Honkanen et al, Brit J. Nutr., 2016)

### Reagentes e soluções:

- Solução HCl 1M;
- Hexano:isopropanol (3:2, v/v);
- Água destilada;
- Sulfato de sódio anidro.

### Procedimentos:

1. Adicionar a cada tubo 500 µL de água destilada e 4 mL de hexano:isopropanol (3:2, v/v);
2. Agitar em vortex durante 10 segundos e adicionar 200 µL de solução HCl 1M;
3. Voltar a agitar em vortex durante 10 segundos (verificar se o pH está ácido com papel indicador) e centrifugar durante 5 minutos;
4. Retirar a fase lipídica superior, com cuidado, e com ajuda de uma pipeta de Pasteur, e colocar num tubo de ensaio novo o qual já contém cerca de 200 mg de sulfato de sódio anidro;
5. Adicionar novamente 4 mL de hexano:isopropanol (3:2, v/v) ao resíduo inferior que ficou do passo 4;
6. Agitar em vortex durante 10 segundos e centrifugar durante 5 minutos;
7. Retirar a fase orgânica superior para o mesmo tubo com sulfato de sódio do passo 4;
8. Centrifugar os tubos com sulfato de sódio durante 5 minutos e transferir a fase líquida para um novo tubo (ou para um erlenmeyer de 50 mL).
9. Evaporar o solvente dos tubos em corrente de azoto a 37 °C (ou em evaporador rotativo).

### **Anexo 3. Separação de classes lipídicas por cromatografia de extração em fase sólida (SPE)**

(adaptado de Ruizet et al. Anal Chim. Acta, 2004 and Kaluz and Burdge et al, Brit. J. Nutr., 2000, Hee-Yong kim, JLR 1990)

#### Reagentes e soluções:

- n-Hexano;
- Diclorometano;
- Metanol;
- Éter dietílico: ácido acético (98:2, v/v)
- Colunas de SPE, NH<sub>2</sub>-aminopropil, 500 mg/3 mL.

#### Procedimento:

1. Utilizar um sistema de “SPE vacum manifold”, e equilibrar a coluna de SPE com 4 mL de hexano com o cuidado de não deixar secar a coluna;
2. Dissolver o extrato lipídico (20mg) em 1 mL de Diclorometano e aplicar na coluna;
3. Eluir com 2 mL de hexano (recolher gota a gota para um tubo de ensaio) para recolha dos ÉSTERES DO COLESTROL (EC) – **FRAÇÃO 1**;
4. Colocar um novo tubo e eluir com 5 mL de Diclorometano para recolha dos MONO-, DI- E TRIACILGLICERÓIS (TAG) – **FRAÇÃO 2**;
5. Colocar um novo tubo e eluir com 5 mL de éter dietílico: ácido acético (98:2, v/v) para recolha dos ÁCIDOS GORDOS LIVRES (AGL) – **FRAÇÃO 3**;
6. Eluir com 10 mL de metanol (recolher gota-a-gota para um erlenmeyer), para recolha dos FOSFOLÍPIDOS (PC) – **FRAÇÃO 4**;
7. Proceder à evaporação do solvente de todas as frações em evaporador rotativo ou em corrente de azoto (no caso dos tubos de ensaio) a 37 °C;
8. Dissolver o conteúdo de cada erlenmeyer em tolueno para a metilação (transesterificação combinada) e transferir para tubos.

#### **Anexo 4. Transesterificação direta combinada de conteúdo ruminal, abomaso ou bactérias**

(Adaptado de Alves et al. 2013)

##### Reagentes e soluções:

- Tolueno seco;
- n-Hexano com adição de 25 mg/L de BHT;
- n-Hexano para GC;
- Sulfato de sódio anidro;
- Água ultrapura;
- Metóxido de sódio 0,5M em metanol;
- Ácido clorídrico em metanol 1,25M (sigma REF: 17935) ou preparar solução 5% HCl em metanol por adição de cloreto de acetilo em metanol seco (ATENÇÃO: reação isotérmica, adicionar muito lentamente e com agitação o cloreto de acetilo ao metanol);
- Solução aquosa 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;
- Padrão interno, éster metílico C19:0 (1 mg/mL em n-Hexano).

##### Procedimento:

Nota: A quantidade de amostra deve ser de tal modo a conter 10 a 50 mg de ácidos gordos. Aproximadamente 250 a 500 mg de conteúdo ruminal, abomaso ou bactérias.

1. Adicionar 1 mL de tolueno seco e 1 mL de padrão interno (1 mg/mL),
2. Adicionar 2 mL solução metóxido de sódio em metanol 0,5 M e levar ao vortex (10 segundos);
3. Colocar em banho de água a 50 °C durante 15 minutos, e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
4. Adicionar 3 mL de solução HCl/metanol e agitar em vortex (10 segundos);
5. Colocar novamente em banho de água a 80 °C durante 20 minutos, e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
6. Adicionar 2 X 1 mL da solução 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (em 2 porções de 1 mL) e 2 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 segundos) e centrifugar durante 5 minutos;
7. Recolher o sobrenadante para um novo tubo que já contém 0,5 g de sulfato de sódio anidro;
8. Agitar o tubo com o sulfato de sódio anidro em vortex (10 segundos) e centrifugar durante 5 minutos;
9. Retirar a fase de hexano que contém os ésteres metílicos para um novo tubo e evaporar em corrente de azoto a 37 °C,
10. Adicionar 1 mL de n-hexano para GC e colocar num vial de GC.